



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

COMPARAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE *GIARDIA* SPP. E *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.
ENTRE CANÍDEOS DE CLÍNICA E DE CANIL DA REGIÃO DE LISBOA, PORTUGAL

JOANA CATARINA MARQUES VALENTE MENESES TEIXEIRA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

Doutora Yolanda Maria Vaz

Doutor José Augusto Farraia e Silva
Meireles

ORIENTADOR

Doutor José Augusto Farraia e
Silva Meireles

COORIENTADOR

Dr. António Pedro Bispo Fachada

2019

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

COMPARAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE *GIARDIA* SPP. E *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.
ENTRE CANÍDEOS DE CLÍNICA E DE CANIL DA REGIÃO DE LISBOA, PORTUGAL

JOANA CATARINA MARQUES VALENTE MENESES TEIXEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

Doutora Yolanda Maria Vaz

Doutor José Augusto Farraia e Silva
Meireles

ORIENTADOR

Doutor José Augusto Farraia e
Silva Meireles

COORIENTADOR

Dr. António Pedro Bispo Fachada

2019

LISBOA

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor José Meireles, por toda a gentileza, disponibilidade, ajuda e esclarecimentos prestados durante as atividades laboratoriais e durante a escrita da dissertação de mestrado.

Ao meu co-orientador, Dr. Pedro Fachada, por toda a sabedoria e conhecimentos partilhados, pelo gosto em ensinar, profissionalismo, amizade e boa disposição não só durante o estágio final, mas também ao longo dos vários anos do curso.

A toda a equipa da clínica Linda-a-Vet, pela amabilidade com que me receberam, ainda durante o tempo de faculdade, e por todos os ensinamentos transmitidos que foram tão importantes para a minha formação.

Aos veterinários, Dra. Marta Videira e ao Dr. Carlos Morbey, e a toda a equipa técnica da Casa dos Animais de Lisboa e do CRO de Cascais, por me disponibilizarem o acesso às instalações para a colheita das amostras necessárias e por toda a ajuda e informação facultadas.

Ao Professor Telmo Nunes, pela ajuda no tratamento estatístico dos dados.

À Dra. Lídia Gomes, por todas as dúvidas esclarecidas, pela ajuda na realização de vários procedimentos laboratoriais e pelo seu bom humor.

Ao Dr. André Pereira, pelos ensinamentos partilhados sobre a identificação de *Giardia* spp. através da flutuação após centrifugação com sulfato de zinco, fundamental para a realização da parte prática desta dissertação de mestrado; e pela possibilidade da realização de genotipagem molecular em colaboração com o Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

Ao Laboratório de Parasitologia e de Doenças Parasitárias da FMV-UL, por todo o apoio logístico na realização dos exames coprológicos.

Aos meus pais, as pessoas mais importantes, por me acompanharem em todos os momentos, por todo o apoio, amor incondicional e por me fazerem acreditar sempre.

À minha família, pelo apoio e amizade.

Aos meus amigos, por serem pessoas especiais e genuínas.

Ao Willy, por ter sido o melhor companheiro de quatro patas, companheiro de aventuras e momentos inesquecíveis, mas também de todas as horas difíceis de estudo ao longo do curso, nas quais me conseguia sempre transmitir serenidade. Um ser extraordinário que me acompanhou nestes últimos 17 anos e que me ensinou a ser uma pessoa melhor com a sua doçura, amizade e espírito lutador.

Resumo

Comparação da prevalência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. entre canídeos de clínica e de canil da região de Lisboa, Portugal

Os protozoários do género *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. são parasitas com uma distribuição mundial, responsáveis por causar infeção clínica e subclínica numa grande variedade de hospedeiros, incluindo os humanos e outros vertebrados, como os cães. Estes são dos parasitas com maior prevalência no cão, principalmente em ambiente de canil, onde o seu risco zoonótico é potenciado.

Neste estudo procedeu-se à colheita de 60 amostras fecais, sendo 30 provenientes de cães de uma clínica veterinária e as restantes 30 provenientes de cães de dois canis (Lisboa e Cascais). Este estudo teve o objetivo de comparar as prevalências entre estas duas populações caninas; estudar as associações entre os fatores origem, idade, sexo, raça e consistência fecal e a infeção por estes protozoários; e comparar os vários métodos de diagnóstico utilizados. Todas as amostras foram submetidas a imunofluorescência direta (IFD), flutuação após centrifugação com sulfato de zinco e coloração de Ziehl-Neelsen. As prevalências globais obtidas para *Giardia* spp. foram de 33,3% através da IFD, 30% através da flutuação após centrifugação com sulfato de zinco e 16,7% através da coloração de Ziehl-Neelsen, havendo uma boa concordância estatística entre a primeira e a segunda técnicas ($k=0,69$). Relativamente a *Cryptosporidium* spp., foi obtida uma prevalência global de 5%, tanto por IFD como pela coloração de Ziehl-Neelsen, entre as quais também se observou uma boa concordância estatística ($k=0,65$). Houve uma maior prevalência significativa ($p<0,05$) de *Giardia* spp. nos cães de canil (65,2%), nos cães do canil de Lisboa (86,7%) e nos cães de canil cujas fezes apresentavam consistência líquida (100%) e pastosa (68,8%). Relativamente a *Cryptosporidium* spp., não se encontrou qualquer associação com os fatores estudados. A associação parasitária de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. foi a mais frequente e estatisticamente significativa. Nas amostras positivas a *Giardia* spp. que foram genotipadas (10/20), apenas foram encontrados os *assemblages* C e D.

Este estudo demonstrou uma maior prevalência destes protozoários, principalmente de *Giardia* spp., em ambiente de canil e comparativamente a outros endoparasitas. A origem de canil foi considerada um fator de risco para a infeção por *Giardia* spp., com um risco superior em cães provenientes de canis com um maior número de animais. A flutuação após centrifugação com sulfato de zinco e a coloração de Ziehl-Neelsen revelaram ser as técnicas com um maior custo-benefício para a deteção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., respetivamente. Dada a elevada prevalência destes protozoários, principalmente de *Giardia* spp., nos cães de canil, estes animais podem representar um maior risco de transmissão zoonótica para a equipa técnica dos canis estudados e para os futuros tutores adotantes.

Palavras-chave: *Giardia*, *Cryptosporidium*, cães, diagnóstico, prevalência, Lisboa

Abstract

Comparison of the prevalence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. between dogs from clinic and kennel of the Lisbon region, Portugal

The protozoans *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. are parasites with worldwide distribution that cause clinical and subclinical infection in a wide range of hosts, including humans and other vertebrates, like dogs. These protozoan parasites are one of the most prevalent in dogs, mainly in kennel environment where its zoonotic risk is magnified.

In this study, 60 fecal samples were collected, of which 30 are from dogs of a veterinary clinic and the other 30 are from dogs of two kennels (Lisbon and Cascais). This study aimed to compare the prevalences between these two canine populations; study the associations between the factors origin, age, sex, breed and fecal consistency and infection by these protozoans; and compare the different diagnostic methods used. All fecal samples were subjected to direct immunofluorescence, zinc sulphate centrifugal flotation and Ziehl-Neelsen staining.

The prevalences obtained for *Giardia* spp. were 33,3% by direct immunofluorescence, 30% by zinc sulphate centrifugal flotation and 16,7% by Ziehl-Neelsen staining, with a good statistical agreement between the first and second techniques ($k=0,69$). In relation to *Cryptosporidium* spp., a prevalence of 5% was observed by both direct immunofluorescence and Ziehl-Neelsen staining, also with a good statistical agreement between these techniques ($k=0,65$). There was significantly ($p<0,05$) higher prevalence of *Giardia* spp. in kennelled dogs (65,2%), in dogs from Lisbon kennel (86,7%) and in kennel dogs with liquid (100%) and pasty (68,8%) fecal consistency. Any risk factors or association to fecal consistency were found in relation to *Cryptosporidium* spp. Parasitic association of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. was the most prevalent and statistically significant. In positive samples of *Giardia* spp. that were subjected to molecular genotyping (10/20), it was only found *assemblages* C and D.

This study has showed a greater prevalence of these protozoans, mostly of *Giardia* spp., in kennel environment and comparatively to other endoparasites. Kennel origin was considered a risk factor for *Giardia* spp. infection, with a greater risk in dogs from kennels with a higher number of animals. Zinc sulphate centrifugal flotation and Ziehl-Neelsen staining have proven to be the techniques with a higher cost-benefit for *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. detection, respectively. Given the high prevalence of these parasites, mostly of *Giardia* spp. in kennel dogs, these animals can pose a greater risk of zoonotic transmission to the technical team of the studied kennels and to the future owners.

Keywords: *Giardia*, *Cryptosporidium*, dogs, diagnosis, prevalence, Lisbon

Índice geral

Índice geral	iv
Lista de figuras	viii
Lista de tabelas.....	ix
Lista de gráficos.....	ix
Lista de abreviaturas, siglas, unidades e símbolos	xi
Capítulo I: Atividades Desenvolvidas durante o Estágio Curricular	1
1. Estágio em Clínica de Animais de Companhia	1
2. Estágio no Laboratório de Parasitologia e de Doenças Parasitárias	2
Capítulo II: Revisão Bibliográfica	3
1. Introdução	3
2. Nota histórica	3
2.1. <i>Giardia</i> spp.	3
2.2. <i>Cryptosporidium</i> spp.	4
3. Taxonomia	5
3.1. <i>Giardia</i> spp.	5
3.1.1. Espécies do género <i>Giardia</i>	5
3.2. <i>Cryptosporidium</i> spp.	6
3.2.1. Espécies do género <i>Cryptosporidium</i>	8
4. Biologia	9
4.1. Biologia e morfologia de <i>Giardia duodenalis</i>	9
4.2. Ciclo biológico de <i>Giardia duodenalis</i>	12
4.3. Biologia e morfologia de <i>Cryptosporidium</i> spp.	14
4.4. Ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	17
5. Epidemiologia.....	21
5.1. Transmissão	21
5.2. Prevalência	23
5.3. Importância zoonótica	24
6. Patogenia	26
6.1. Fatores parasitários	26
6.1.1. Adesão e invasão	26

6.1.2. Remodelação do citoesqueleto, disrupção da barreira epitelial e perda da sua função.....	27
6.1.3. Inflamação e resposta imunitária	27
6.1.4. Apoptose.....	28
6.1.5. Lesão celular	29
6.1.6. Fatores de virulência e diversidade genética	29
6.2. Fatores do hospedeiro	30
6.2.1. Sistema imunitário	30
6.2.2. Interação com a microbiota intestinal	30
7. Diagnóstico	31
7.1. Sinais clínicos	31
7.2. Diagnóstico laboratorial.....	32
7.2.1. Técnicas de microscopia convencional	33
7.2.1.1. Esfregaço fecal direto	33
7.2.1.2. Esfregaço fecal corado	34
7.2.1.3. Técnicas de concentração	35
7.2.2. Métodos imunológicos	36
7.2.2.1. Imunoensaios de captura de coproantígenos	36
7.2.2.2. Imunofluorescência direta	38
7.2.3. Métodos moleculares	39
7.2.3.1. <i>Polymerase Chain Reaction</i>	39
8. Controlo.....	41
8.1. Controlo da giardiose	41
8.1.1. Tratamento médico	41
8.1.2. Medidas higiénicas e prevenção	44
8.1.3. Vacinação	45
8.2. Controlo da criptosporidiose	46
8.2.1. Tratamento médico	46
8.2.2. Medidas higiénicas e prevenção	47
9. Considerações de saúde pública.....	48
Capítulo III: Estudo - Comparação da prevalência de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. entre canídeos de clínica e de canil da região de Lisboa, Portugal.....	49
1. Objetivos	49
2. Materiais e métodos	49
2.1. Amostragem e locais de recolha	49
2.2. Caracterização dos centros de recolha oficial de animais	49

2.2.1. Casa dos Animais de Lisboa	49
2.2.2. Centro de Recolha Oficial de Animais de Cascais	51
2.3. Colheita, acondicionamento e transporte das amostras	52
2.4. Métodos de diagnóstico	52
2.4.1. Flutuação após centrifugação com sulfato de zinco	53
2.4.2. Imunofluorescência direta	54
2.4.3. Esfregaço fecal com coloração de Ziehl-Neelsen.....	56
2.5. Genotipagem molecular	57
2.6. Análise estatística	57
3. Resultados	58
3.1. Caracterização geral da amostra	58
3.2. Observação macroscópica das amostras.....	60
3.3. Análises Parasitológicas	61
3.3.1. Resultados globais segundo os vários métodos de diagnóstico.....	61
3.3.1.1. Concordância estatística entre os vários métodos de diagnóstico.....	62
3.3.2. Imunofluorescência direta	62
3.3.2.1. Resultados globais.....	62
3.3.2.2. Infecção por <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. e origem dos cães.....	63
3.3.2.2.1. Prevalência da infecção em cães de clínica e de canil.....	63
3.3.2.2.2. Prevalência da infecção em cães de canis diferentes	64
3.3.2.3. Infecção por <i>Giardia</i> spp., fatores de risco e consistência fecal	65
3.3.2.3.1. Prevalência de <i>Giardia</i> spp. em cães de clínica	65
3.3.2.3.2. Prevalência de <i>Giardia</i> spp. em cães de canil.....	66
3.3.2.4. Infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp., fatores de risco e consistência fecal.....	67
3.3.2.4.1. Prevalência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em cães de canil.....	67
3.3.3. Flutuação após centrifugação com sulfato de zinco	68
3.3.4. Esfregaço fecal com coloração de Ziehl-Neelsen.....	71
3.3.5. Prevalência global de endoparasitas e associações parasitárias	72
3.3.5.1. Influência da presença de nemátodes.....	75
3.4. Genotipagem molecular	76
4. Discussão.....	76
4.1. Resultados globais.....	76
4.2. Comparação dos vários métodos de diagnóstico	77
4.3. Prevalência e fatores de risco	82
4.3.1. Origem.....	82
4.3.2. Idade.....	85
4.3.3. Sexo	86

4.3.4. Raça	87
4.4. Prevalência e consistência fecal	88
4.5. População parasitária	89
4.6. Associações parasitárias	91
4.7. Potencial zoonótico.....	92
5. Conclusão	94
6. Recomendações e perspectivas futuras.....	96
Bibliografia.....	97
Anexo I	111
Anexo II	113
Anexo III	113
Anexo IV	114

Lista de figuras

Figura 1 – Composição estrutural do citoesqueleto de <i>Giardia duodenalis</i> . Corte de microscopia eletrônica de varrimento (A); Vista dorsal (B) e lateral (C) de um trofozoíto em modelo 3D. Adaptado de The PLOS ONE Staff, 2014.	10
Figura 2 – Adesão do trofozoíto de <i>G. duodenalis</i> através da aba ventrolateral (setas) e disco ventral (pontas de setas). A aba ventrolateral circunda parcialmente o disco ventral, deixando de o fazer na região posterior onde o par de flagelos ventrais emerge (B). Imagens de microscopia eletrônica de varrimento. Adaptado de Erlandsen et al., 2004.	11
Figura 3 – Quistos de <i>Giardia</i> spp. Imagem de microscopia eletrônica de varrimento. Adaptado de Erlandsen et al., 2004.	11
Figura 4 – Representação esquemática do trofozoíto (a) e do quisto (b) de <i>G. duodenalis</i> . Adaptado de Ankarklev et al., 2010.	12
Figura 5 – Ciclo de vida de <i>Giardia duodenalis</i> . Adaptado de Ankarklev et al., 2010.	12
Figura 6 – Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. de parede fina (A) e de parede espessa (B) em corte; imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Adaptado de Fayer, 2007.	15
Figura 7 – Esporozoíto de <i>Cryptosporidium</i> spp; representação esquemática (A) e imagem de microscopia eletrônica de varrimento (B). Adaptado de Smith et al., 2005 (A) e Koh et al., 2014 (B).	16
Figura 8 – Trofozoíto (A) e merozoíto de <i>Cryptosporidium</i> spp. no estadio inicial da adesão à célula epitelial (B); imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Adaptado de Fayer, 2007.	16
Figura 9 – Meronte na fase inicial da formação dos merozoítos, acima de cada polo dos dois núcleos (A); Microgamonte maturo onde são visíveis seis microgâmetas separados do corpo residual (B); Macrogamonte contendo o núcleo de um microgâmetas (C); imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Adaptado de Fayer, 2007.	17
Figura 10 – Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp. Adaptado de Cacciò & Putignani, 2014.	18
Figura 11 – Meronte tipo I com oito merozoítos (A); Meronte tipo II com quatro merozoítos (B); Macrogamonte fertilizado ou zigoto (C), imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Adaptado de Akiyoshi, Dilo, Pearson, Chapman, Tumwine & Tzipori, 2003.	19
Figura 12 – Ciclos de transmissão de <i>Cryptosporidium</i> spp. e <i>Giardia</i> spp. Adaptado de Thompson & Ash, 2016.	23
Figura 13 – Mecanismos patogénicos de <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium</i> . Representação esquemática do epitélio intestinal saudável (A) e após a infeção por estes dois protozoários (B). Adaptado de Certad et al., 2017.	31
Figura 14 – Alojamento dos animais em parques, no CRO de Lisboa. Fonte original.	50
Figura 15 – A) Alojamento dos animais em boxes partilhadas, no CRO de Lisboa; B) Pavimento das boxes, no CRO de Lisboa. Fonte original.	50
Figura 16 – Flutuação após centrifugação com sulfato de zinco: A) Centrifugação das amostras; B) Preenchimento dos tubos de ensaio até formação de um menisco convexo e colocação das lamelas. Fonte original.	54
Figura 17 – Imunofluorescência direta: A) Amostras fecais nos tubos de ensaio após a sua diluição em PBS e de seguida, a sua colocação nos poços das lâminas de imunofluorescência; B) Fixação das lâminas em acetona; C) Observação das lâminas ao microscópio de fluorescência. Fonte original.	56
Figura 18 – Esfregaço fecal com coloração de Ziehl-Neelsen: A) Lâminas a secar após coloração e reagentes utilizados na sua preparação; B) Lâminas prontas a observar ao microscópio ótico. Fonte original.	57
Figura 19 – Amostras submetidas a imunofluorescência direta, positivas a <i>Giardia</i> spp. (A) e a <i>Cryptosporidium</i> spp. (B). Fonte original.	63
Figura 20 – Quistos de <i>Giardia</i> spp. observados pela técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco. Fonte original.	69
Figura 21 – Ovos de ancilostomídeos em diferentes estadios em amostras submetidas à técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco. Fonte original.	69

Figura 22 – Amostras submetidas à técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco, positivas a <i>Toxocara canis</i> . Fonte original.	70
Figura 23 – Amostras submetidas à técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco, positivas a <i>Cystoisospora</i> spp. Fonte original.	70
Figura 24 – Quistos de <i>Giardia</i> spp. observados pela técnica de esfregaço fecal com coloração de Ziehl-Neelsen. Fonte original.	72
Figura 25 – Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. observados pela técnica de esfregaço fecal com coloração de Ziehl-Neelsen. Fonte original.	72
Figura 26 – Coinfeção por <i>Giardia</i> spp. e <i>Cystoisospora</i> spp. em amostra submetida à técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco. Fonte original.	74

Lista de tabelas

Tabela 1 – Taxonomia dos <i>assemblages</i> de <i>Giardia duodenalis</i> atualmente reconhecidos e a sua distribuição por hospedeiros. Adaptado de Cacciò, Lalle, & Svärd, 2017; Ryan & Cacciò, 2013.	6
Tabela 2 – Escala de classificação da consistência fecal.	52
Tabela 3 – Prevalência de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. de acordo com os métodos de diagnóstico utilizados.	61
Tabela 4 – Grau de concordância estatística entre os vários métodos de diagnóstico utilizados para cada parasita.	62
Tabela 5 – Prevalências de <i>Giardia</i> spp., de <i>Cryptosporidium</i> spp. e prevalência global na amostra populacional, submetida a imunofluorescência direta (n=60).	63
Tabela 6 – Prevalência de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. e associação estatística (valor p) com a origem (clínica/canil) dos cães.	64
Tabela 7 – Prevalência de <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp. e associação estatística (valor p) com a origem (CRO Lisboa/CRO Cascais) dos cães.	65
Tabela 8 – Efeito da idade, sexo, raça e consistência fecal na prevalência de <i>Giardia</i> spp. em cães de clínica.	66
Tabela 9 – Efeito da idade, sexo, raça e consistência fecal na prevalência de <i>Giardia</i> spp. em cães de canil.	67
Tabela 10 – Efeito da idade, sexo, raça e consistência fecal na prevalência de <i>Cryptosporidium</i> spp. em cães de canil.	68
Tabela 11 – Prevalência de endoparasitas (exceto <i>Giardia</i> spp. e <i>Cryptosporidium</i> spp.) consoante a consistência fecal.	71
Tabela 12 – Prevalência e origem das coinfeções parasitárias na amostra populacional (n=60).	75

Lista de gráficos

Gráfico 1 – Distribuição da amostra em estudo consoante a origem (n=60).	59
Gráfico 2 – Distribuição da amostra populacional em função do sexo (n=59).	59
Gráfico 3 – Distribuição da amostra em estudo consoante a raça (n=59).	60
Gráfico 4 – Distribuição dos animais por idade (n=58).	60
Gráfico 5 – Distribuição das amostras fecais consoante a sua consistência (n=60).	61
Gráfico 6 – Prevalência dos parasitas intestinais encontrados na amostra populacional submetida à técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco (n=60).	71
Gráfico 7 – Distribuição e prevalência individual dos parasitas intestinais encontrados na amostra populacional, consoante a sua origem (clínica/canil).	73
Gráfico 8 – Distribuição da amostra populacional consoante o tipo de infeção (n=60).	74

Gráfico 9 – Distribuição da amostra populacional (n=60) em função da presença ou ausência da coinfeção de <i>Giardia</i> spp. com <i>Cryptosporidium</i> spp.	75
Gráfico 10 – Distribuição das amostras consoante a presença ou ausência de protozoários e de nemátodes (n=60).	76

Lista de abreviaturas, siglas, unidades e símbolos

ADN - Ácido desoxirribonucleico

C. - *Cryptosporidium*

CAPC - *Companion Animal Parasite Council*

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CONTROL+ - Lâmina de controlo positivo

CRO - Centro de Recolha Oficial

CWP - *Cyst wall protein*

ELISA - *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

ESCCAP - *European Scientific Counsel Companion Animal Parasites*

FMV-UL - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

G. - *Giardia*

IC - Imunocromatografia

IC 95% - Intervalo de confiança de 95 por cento

IFD - Imunofluorescência direta

Ig - Imunoglobulina

k - Kappa

kDa - Quilodalton

mg/kg - Miligramas por quilograma

ml - Mililitro

p - Nível de significância

OMS - Organização Mundial de Saúde

OR – *Odds ratio*

PBS - Tampão fosfato-salino

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

rRNA - Ácido ribonucleico ribossomal

RR2 - Reagente Crypto/*Giardia* Cel

SAF - Acetato de sódio - ácido acético - formalina

SIDA - Síndrome da imunodeficiência adquirida

spp. - Espécies

vs. - Versus

VSP - *Variant-specific surface protein*

ZO - *Zonula occludens*

µl - Microlitros

µm - Micrómetros

nm - Nanómetros

χ² - Teste Qui-quadrado de *Pearson*

% - Prozentagem

°C - Graus Celsius

Capítulo I: Atividades Desenvolvidas durante o Estágio Curricular

O estágio curricular foi realizado em duas fases distintas: a primeira decorreu durante um período de 6 meses numa clínica de animais de companhia, entre 13 de Outubro de 2015 e 13 de Abril de 2016, e foi acompanhada pelo Dr. Pedro Fachada; a segunda fase teve lugar no Laboratório de Parasitologia e de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa (FMV-UL), durante um período de 5 meses, entre Maio e Setembro de 2016, e foi orientada pelo Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles.

1. Estágio em Clínica de Animais de Companhia

Esta fase do estágio foi realizada na clínica Linda-a-Vet localizada em Linda-a-Velha, Oeiras, teve uma duração total de 1254 horas e englobou a participação nos diversos serviços integrados na clínica, nomeadamente: medicina interna (528h), cirurgia (396h), internamento (198h) e imagiologia (132h). As únicas espécies assistidas foram a canina e a felina.

Na área da medicina interna, várias atividades foram desenvolvidas no âmbito das consultas como a anamnese; o exame de estado geral; a contenção dos animais; procedimentos de medicina geral e preventiva como a vacinação, desparasitação e instrução dos tutores para os cuidados básicos a ter com os seus animais, cuidados de higiene e de prevenção de doenças infecciosas; a colheita de materiais biológicos através de vários métodos como raspagens cutâneas e punção aspirativa com agulha fina; exames complementares de diagnóstico como colorações, citologias, esfregaços sanguíneos, urianálises, análises hematológicas e bioquímicas; e administração de fármacos. Assistiu-se a um número considerável de consultas de referência, principalmente na área de oncologia e neurologia, mas também na área de endocrinologia e gastroenterologia. Nestas consultas, é de salientar a realização do estadiamento tumoral, tratamentos de quimioterapia, reavaliação do paciente oncológico, realização de exames neurológicos e acompanhamento de casos clínicos raros e mais complexos. Também se assistiu a consultas de especialidade na área de oftalmologia e de comportamento animal e a urgências médicas.

Na área da cirurgia eram realizados os procedimentos de preparação do animal para as cirurgias, auxílio na realização das cirurgias (de tecidos moles e ortopédicas), destacando-se principalmente a monitorização anestésica pré, intra e pós-cirúrgica. Outros procedimentos frequentemente efetuados foram o auxílio de procedimentos cirúrgicos com recurso a endoscopia e a colocação de sondas esofágicas.

A área da imagiologia incluiu a realização de exames de radiologia, ecografia de rotina e especializada, o auxílio na contenção dos animais durante os mesmos e a interpretação dos resultados. Destacam-se alguns procedimentos e exames, aos quais se assistiram, como a pericardiocentese ecoguiada, punções ecoguiadas e ecocardiografias. No internamento foi possível executar procedimentos mais variados como a colheita de vários tipos de amostras,

colocação de cateteres, transfusões sanguíneas, colocação de pensos e talas, monitorização dos pacientes, cuidados de higiene e alimentação dos mesmos.

2. Estágio no Laboratório de Parasitologia e de Doenças Parasitárias

O estágio no Laboratório de Parasitologia e de Doenças Parasitárias da FMV-UL teve uma duração total de 172 horas. Durante este período foram efetuadas uma aprendizagem mais aprofundada sobre o método de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco e um aperfeiçoamento na identificação dos quistos de *Giardia* spp. através do mesmo (12h); a colheita das amostras fecais e a recolha dos dados dos animais nos canis e clínica veterinária (16h); o processamento e análise das amostras por flutuação após centrifugação com sulfato de zinco e pela coloração de Ziehl-Neelsen (120h); e o processamento e análise das amostras por imunofluorescência direta (IFD) (24h).

Capítulo II: Revisão Bibliográfica

1. Introdução

Os animais de estimação têm-se tornado cada vez mais parte integrante do seio familiar por todo o mundo, desenvolvendo fortes laços com os seus tutores e contribuindo para o seu bem-estar e saúde tanto física como psicoemocional. Apesar de todas os seus benefícios, os cães e os gatos podem servir de fontes de infeção esporádicas por vários agentes infecciosos como bactérias, vírus e parasitas, especialmente se não forem cuidados de forma adequada (de Lucio et al., 2017). Entre os vários agentes infecciosos, incluem-se os protozoários sobre os quais incide esta dissertação, *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. Estes são dos parasitas mais importantes e frequentemente reportados a nível mundial, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, que causam infeção clínica e subclínica numa grande variedade de hospedeiros, incluindo os humanos e muitos outros vertebrados, como os cães (Bouزيد, Halai, Jeffreys, & Hunter, 2015; de Lucio et al., 2017).

Ao longo dos tempos, os animais de companhia têm sido apontados como uma importante fonte de infeção por estes parasitas para os humanos. Contudo, esta é uma questão que tem sido cada vez mais foco de debate e estudos recentes sugerem que o risco de transmissão entre animais e pessoas é quase nulo. Isto deve-se ao facto de os animais e as pessoas serem infetados com *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. de genótipos diferentes, sendo a sua transmissão cruzada atípica em circunstâncias económicas, sanitárias e de saúde normais (Bowman & Lucio-Forster, 2010), sendo nestes casos a transmissão antroponótica a via predominante (de Lucio et al., 2017).

Esta dissertação tem como objeto de estudo a pesquisa de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. em cães de canil e de clínica de forma a comparar a prevalência entre estes, estudar os fatores que influenciam estas parasitoses e comparar os vários métodos de diagnóstico. Pretende-se assim, obter uma visão geral da epidemiologia destes dois parasitas na região de Lisboa e avaliar vantagens e desvantagens dos vários métodos de diagnóstico do ponto de vista do utilizador.

2. Nota histórica

2.1. *Giardia* spp.

O protozoário atualmente designado como *Giardia* (G.), foi observado e descrito pela primeira vez em 1681 pelo cientista Antony van Leeuwenhoek (1632-1723), quando este examinava ao microscópio ótico as suas fezes diarreicas. Mais tarde, em 1859, o parasita foi descrito com grande detalhe pelo médico checo Vilém Dušan Lambl (1824-1895), ao observar fezes diarreicas de crianças, tendo-o designado como *Cercomonas intestinalis* por pensar que este pertencia ao género *Cercomonas* spp. O termo *Giardia* foi introduzido pela primeira vez em 1882 por Kunstler, ao observar este protozoário em girinos, e em 1888, o zoólogo Raphaël

Anatole Émile Blanchard (1857-1919) sugeriu a designação de *Lamblia intestinalis* (Levine, 1979; Adam, 2001). Esta designação foi posteriormente alterada para *Giardia duodenalis* pelo parasitologista americano Charles Wardell Stiles (1867-1941), em 1902 (Adam, 2001).

Charles Atwood Kofoid (1865-1947) e Elizabeth Bohn Christiansen introduziram o nome *Giardia lamblia* em 1915, em homenagem ao trabalho do Professor Alfred Mathieu Giard (1846-1908) em Paris e de Lambl em Praga (Ford, 2005) e, *G. enterica* em 1920 (Adam, 2001). Desde então, continuou a haver controvérsia em relação ao número e nomenclatura das espécies de *Giardia*, com alguns investigadores a sugerir uma classificação com base no hospedeiro de origem e outros com base na morfologia. Por exemplo, em 1952, Filice propôs o agrupamento das espécies de *Giardia* em três grupos diferentes, com base na morfologia do corpo mediano: *G. duodenalis*, *G. muris* e *G. agilis*. Relativamente à espécie que infeta o homem e outros mamíferos, o nome *Giardia lamblia* tornou-se amplamente aceite na década de 1970. Na década de 1980, começou também a ser utilizado o nome *Giardia duodenalis* e a partir de 1990 também se utilizava o nome de *G. intestinalis* (Adam, 2001). Hoje em dia, ainda se utilizam os três termos como sinónimos, sugerindo a contínua controvérsia relativamente à nomenclatura deste parasita (Ford, 2005).

Até meados das décadas de 1950 e 1960, *Giardia* era considerado um parasita comensal, passando a reconhecer-se a sua capacidade patogénica quando a partir desta altura começou a ser identificado como causador de surtos de diarreia de origem aquática que chegavam a afetar milhares de pessoas, tanto na Europa como nos Estados Unidos da América (Veazie, Brownlee & Sears, 1979; *World Health Organization* [WHO], 1981). Contudo foi apenas em 1981 que a Organização Mundial de Saúde (OMS) acrescentou *Giardia* à sua lista de parasitas patogénicos (WHO, 1981).

2.2. *Cryptosporidium* spp.

A primeira descrição de *Cryptosporidium* spp. foi feita por Ernest Edward Tyzzer (1875-1965), em 1907, resultado da sua observação frequente deste parasita nas glândulas gástricas de ratos de laboratório, identificando-o como um esporozoário de taxonomia desconhecida. Em 1910, Tyzzer realizou uma descrição mais detalhada do protozoário e propôs o nome *Cryptosporidium* (C.) para designar o novo género e o nome *Cryptosporidium muris* para designar a espécie que observara. Em 1912, Tyzzer descreveu uma nova espécie, *C. parvum*, que se diferenciava da primeira por se desenvolver no intestino delgado e por ter oocistos de menor dimensão (Fayer, 2007).

Durante 48 anos após a descoberta de Tyzzer, não se realizaram mais estudos sobre este parasita pois não era considerado um agente de importância económica, médica ou veterinária. Mesmo a identificação de uma nova espécie em 1955, *C. meleagridis*, associada a doença e morte em perús, não despertou o interesse da comunidade científica (Tzipori & Griffiths, 1998). Na década de 70, foram reportados os primeiros quatro casos de infeção em

humanos, associados a condições de imunossupressão. *Cryptosporidium* foi também identificado em outras espécies, como em vacas, ovelhas, porcos, cavalos, perús, coelhos, macacos, cobras e porcos-da-índia, mas até aqui foi sempre associado a casos de infecção oportunista ou inofensiva. Só a partir da década de 80 se reconheceu a verdadeira importância deste parasita na área da medicina veterinária, medicina humana e saúde pública. Isto porque em 1980, foi reconhecido como um agente primário importante, frequente e altamente contagioso em surtos de diarreia aguda em vitelos, borregos, veados-vermelhos e cabritos. Posteriormente em 1983, a criptosporidiose foi considerada uma doença potencialmente fatal em doentes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). E por fim, em 1993, *Cryptosporidium parvum* atingiu a esfera da saúde pública após um grande surto em Milwaukee que envolveu cerca de 403.000 pessoas, tendo sido amplamente reconhecido como o agente mais importante, e de difícil controlo, causador de surtos de diarreia associados à ingestão de água contaminada (Fayer, 2007; Tzipori & Griffiths, 1998). Relativamente à criptosporidiose canina, esta foi pela primeira vez reportada em 1983 num cachorro com uma semana de idade. A maioria dos casos foi reportada em cachorros ou em animais com imunossupressão, associada por exemplo ao vírus da esgana (Riggs, 2018a).

3. Taxonomia

A taxonomia de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. tem sido controversa desde o início do século 20, principalmente devido à sua grande variedade de hospedeiros e à escassez de características morfológicas fiáveis para definir as espécies. A utilização de técnicas moleculares nos últimos anos, tem vindo a contribuir para uma taxonomia mais correta (Thompson & Ash, 2016), uma vez que leva a um melhor entendimento das relações filogenéticas destes parasitas. Esta informação também é importante na medida em que permite obter um melhor conhecimento da sua biologia, patogenia e epidemiologia, abrindo novas portas para o diagnóstico, tratamento e controlo (Chalmers & Katzer, 2013; Ryan & Xiao, 2014).

3.1. *Giardia* spp.

O género *Giardia* pertence ao reino Protista, subreino Protozoa, infrareino Excavata, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophorea, Ordem Diplomonadida e família Hexamitidae (Mehlhorn, 2016a, 2016c; Thompson & Monis, 2011).

3.1.1. Espécies do género *Giardia*

Atualmente, existem 7 espécies reconhecidas como válidas, com base na morfologia dos trofozoítos e/ou quistos, sendo estas: *G. agilis* nos anfíbios, *G. psittaci* e *G. ardeae* nas aves, *G. muris* e *G. microti* nos roedores, *G. peramelis* nos marsupiais e *G. duodenalis* nos

mamíferos, incluindo os cães e os humanos (Ballweber, Xiao, Bowman, Kahn, & Cama, 2010; Cacciò et al., 2017).

A espécie *G. duodenalis* é considerada um complexo de espécies com pouca variação morfológica entre si, mas constituído por 8 grupos genéticos distintos/*assemblages* (A a H), com uma diferente especificidade de hospedeiros (Tabela 1). A grande distância genética entre os vários *assemblages* e a comparação com base na análise do genoma total dos *assemblages* A, B e E, sugerem que os vários *assemblages* representam espécies distintas (Ryan & Cacciò, 2013). Assim, foi realizada uma revisão taxonómica e uma nova nomenclatura relativamente às espécies foi proposta por Thompson & Monis (2012) (Tabela 1).

Tabela 1 – Taxonomia dos *assemblages* de *Giardia duodenalis* atualmente reconhecidos e a sua distribuição por hospedeiros. Adaptado de Cacciò, Lalle, & Svärd, 2017; Ryan & Cacciò, 2013.

Assemblage	Nomenclatura proposta	Hospedeiros
A	<i>Giardia duodenalis</i>	Humanos e outros primatas, animais de pecuária, cães, gatos, cavalos, roedores e alguns animais selvagens
B	<i>Giardia enterica</i>	
C	<i>Giardia canis</i>	Cães e outros canídeos selvagens
D		
E	<i>Giardia bovis</i>	Bovinos e outros ungulados
F	<i>Giardia cati</i>	Gatos
G	<i>Giardia simondi</i>	Roedores
H	-	Pinípedes

A maioria dos *assemblages* (C a G) apresenta uma especificidade de hospedeiro bastante estrita, enquanto que os *assemblages* A e B apresentam uma ampla especificidade de hospedeiro, sendo, por isso, potencialmente zoonóticos. Os cães são parasitados principalmente pelos *assemblages* C e D, no entanto também já foi reportada a presença dos *assemblages* A e B nas fezes destes animais. Apesar dos *assemblages* C e D serem específicos para canídeos, já foram reportados alguns casos de infeção em humanos, assim como em porcos, ovelhas e vacas no Reino Unido, em porcos na Dinamarca, em cabras na Austrália, em focas, em cangurus e inclusivamente em gatos (Cacciò et al., 2017).

3.2. *Cryptosporidium* spp.

Relativamente à posição sistemática, *Cryptosporidium* spp. pertence ao reino Protista, subreino Protozoa, infrareino Alveolata, filo Miozoa, subfilo Myxozoa, infrafilo Apicomplexa e

superclasse Sporozoa (Cavalier-Smith, 2014). Até há pouco tempo, este protozoário pertencia à classe Coccidiomorphea, subclasse Coccidia, ordem Eimeriida, mas estudos abrangentes a nível microscópico, molecular, genómico e bioquímico, desde a década de 90 (Ryan, Paparini, Monis, & Hijjawi, 2016), foram comprovando que este parasita divergiu na sua evolução não só das coccídias, como também de quase todos os outros parasitas do filo Apicomplexa, e que é mais próximo das gregarinas, a nível filogenético (Ryan & Xiao, 2014; Thompson, 2005). Foi com base nestes estudos e na primeira análise filogenética detalhada e revisão da classificação das gregarinas, levada a cabo por Cavalier-Smith (2014), que se realizou a transferência formal de *Cryptosporidium* spp. para uma nova classe, subclasse e ordem, estabelecidas por este. O género pertence agora à classe Gregarinomorphea, subclasse Cryptogregarina, ordem Cryptogregarida, família Cryptosporidiidae, sendo o único membro desta nova ordem (Ryan et al., 2016).

Cryptosporidium spp. foi originalmente considerado uma coccídia devido a semelhanças no ciclo biológico, em características morfológicas (Ryan & Xiao, 2014; Thompson, 2005) e em algumas vias metabólicas (Ryan & Hijjawi, 2015). Contudo, este protozoário apresenta várias características comuns às gregarinas, que o afastam de uma coccídia típica, como por exemplo: i) a sua localização única na célula hospedeira, onde os estadios de desenvolvimento endógeno ocorrem no interior do vacúolo parasitóforo na superfície apical da célula, na bordadura em escova dos enterócitos; ii) a adesão à célula hospedeira, que se faz através de um organelo alimentador formado na base do vacúolo parasitóforo; iii) a presença de dois tipos morfo-funcionais de oocistos, um de parede espessa e outro de parede fina, sendo o último responsável pelo ciclo de autoinfecção no hospedeiro infetado; iv) a pequena dimensão do oocisto, que não apresenta estruturas como o micrópilo, esporocisto e os grânulos polares; v) ausência de sensibilidade a todos os fármacos anti-coccídios; vi) reação cruzada entre um anticorpo monoclonal anti-criptosporídeo e as gregarinas (Ryan & Hijjawi, 2015; Thompson, 2005) ; vii) a capacidade de completar o seu ciclo de vida na ausência de células hospedeiras, deixando, por isso, de ser um parasita intracelular obrigatório; viii) a presença de estadios extracelulares denominados *gamont-like stages*; ix) presença de sizígia (mecanismo de reprodução); x) mecanismo de alimentação por mizocitose; e, xi) capacidade de alteração da estrutura celular com vista à adaptação ao seu meio ambiente (Ryan et al., 2016).

Cryptosporidium spp. também se diferencia dos outros parasitas do filo Apicomplexa na medida em que apresenta outros mecanismos de motilidade e invasão (Ryan et al., 2016), e pelo facto de ter perdido o apicoplasto (tal como as gregarinas), o genoma do plastídeo e da mitocôndria (Ryan & Xiao, 2014; Ryan & Hijjawi, 2015; Ryan et al., 2016).

3.2.1. Espécies do género *Cryptosporidium*

Ao contrário da abordagem mais conservativa no reconhecimento de novas espécies de *Giardia* spp., relativamente a *Cryptosporidium* spp. houve uma grande proliferação na definição de novas espécies (Thompson & Ash, 2016), a qual se baseava na especificidade do hospedeiro, localização dos estádios endógenos e na morfologia dos oocistos (Chalmers & Katzer, 2013). Contudo, a maioria das espécies não tem uma especificidade estrita para um hospedeiro e os oocistos das diferentes espécies não exibem características morfológicas suficientes para se diferenciar entre si, levando assim a uma classificação incorreta. De forma a promover a estabilidade científica na definição de novas espécies, foi estabelecido um conjunto mínimo de requisitos, biológicos e moleculares, que incluem: os dados morfométricos dos oocistos, caracterização genética com os dados depositados no GenBank, demonstração da especificidade do hospedeiro natural e, quando possível, experimental; e a conformidade com as regras do Código Internacional da Nomenclatura Zoológica (ICZN, do inglês *International Code of Zoological Nomenclature*) (Ryan, Fayer & Xiao, 2014).

Atualmente, existem 31 espécies consideradas válidas (Anexo I) e para além destas, existem cerca de 40 genótipos de estatuto taxonómico desconhecido que poderão vir a ser nomeadas como novas espécies, quando a sua caracterização molecular e biológica cumprir os requisitos acima descritos (Ryan, Zahedi, & Paparini, 2016).

Estudos de genotipagem dos oocistos nas fezes dos cães mostraram que a maioria das infeções nestes animais é causada por *C. canis*, tendo sido também ocasionalmente reportadas as espécies *C. parvum*, *C. muris* (Ryan et al., 2014) e *C. meleagridis* (Ehsan et al., 2017).

A espécie *C. canis* foi originalmente classificada, em 1999, como um genótipo de *C. parvum* (genótipo canino) e só mais tarde, em 2001, foi descrita como espécie. Esta espécie apresenta 3 genótipos, o genótipo canino, o genótipo raposa e o genótipo coiote, afetando as espécies correspondentes (Zahedi, Paparini, Jian, Robertson, & Ryan, 2016). Apesar do hospedeiro principal ser o cão, *C. canis* é também reportado ocasionalmente em pessoas e mostrou ser infetante (experimentalmente) para bovinos (Fayer, 2010; Šlapeta, 2013).

A espécie *C. parvum* apresenta um vasto leque de hospedeiros, sendo os bovinos o seu hospedeiro principal. Os outros hospedeiros parasitados por *C. parvum* incluem ruminantes selvagens, cabras, ovelhas, cavalos, porcos, ratos, veados-de-cauda-branca, cães e humanos (Fayer, 2010). Relativamente à infeção nos cães, esta é refratária, não exibindo sinais clínicos e com a excreção de poucos oocistos (Bowman & Lucio-Forster, 2010). Esta espécie é a mais estudada devido à sua importância zoonótica e é a que apresenta uma maior diversidade genética, com vários genótipos e subtipos identificados (Zahedi et al., 2016).

A espécie *C. muris* apresenta, também, uma grande variedade de hospedeiros, parasitando principalmente roedores. A infeção no cão tem sido reportada ocasionalmente, e nos humanos tem sido identificada em países em desenvolvimento (Ryan et al., 2014).

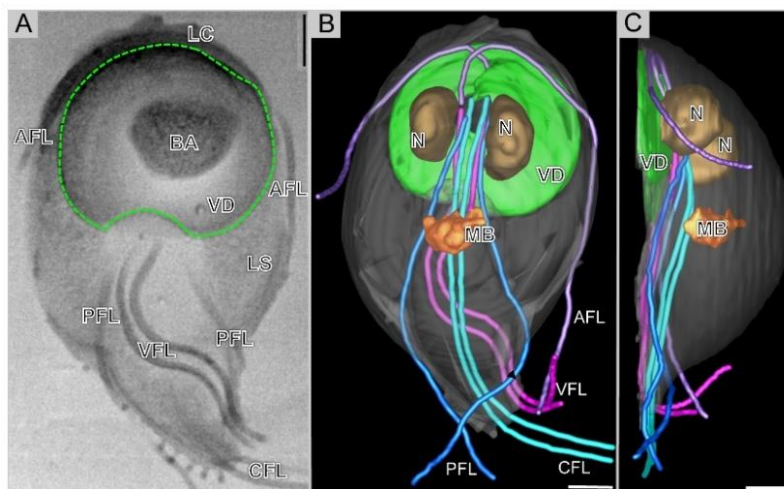
4. Biologia

4.1. Biologia e morfologia de *Giardia duodenalis*.

Giardia spp. é um microrganismo eucariótico unicelular, que possui uma estrutura simples mas peculiar. Este protozoário apresenta características das células eucarióticas, como a presença de núcleo(s) delimitado(s) por uma membrana nuclear, um citoesqueleto e um sistema endomembranar. Por outro lado, possui algumas peculiaridades como a presença de dois núcleos e a ausência de organelos típicos dos organismos eucarióticos como os peroxissomas, as mitocôndrias e o aparelho de Golgi (Carranza & Lujan, 2010; Sulaiman & Cama, 2006). Este parasita é um organismo anaeróbico e possui vias metabólicas típicas das bactérias, adquiridas por transferência lateral de genes. Em 2003 foram descobertos os mitosomas, organelos derivados das mitocôndrias.

Giardia spp. possui dois estádios de desenvolvimento diferentes, a nível estrutural e bioquímico: o trofozoíto e o quisto. O trofozoíto é a forma ativa do parasita que coloniza o epitélio intestinal, sendo assim um parasita extracelular, e que é responsável pela manifestação clínica da doença. Este apresenta um formato piriforme (semelhante a uma pêra ou lágrima) longitudinalmente, simetria bilateral, tem uma superfície ventral plana e uma superfície dorsal convexa (Ankarklev, Jerlström-Hultqvist, Ringqvist, Troell, & Svärd, 2010). As dimensões do trofozoíto variam entre 9 a 21 µm em comprimento, 5 a 12 µm em largura (European Scientific Counsel Companion Animal Parasites [ESCCAP], 2018), e 1 a 2 µm em espessura (Solari, Rahn, Saura, & Lujan, 2003). Possui um citoesqueleto complexo que confere a forma do parasita, é composto por microtúbulos e localiza-se na parte ventral da célula (The PLOS ONE Staff, 2014) (Figura 1, C). Este inclui: 4 pares de flagelos (os anteriores, os postero-laterais, os ventrais e os caudais), que se originam a partir dos corpos basais (Figura 1). O movimento dos flagelos confere ao trofozoíto um movimento dianteiro com rotação em torno do seu eixo longitudinal. Exibem também movimentos de flexão lateral e dorsoventrais, conferindo ao trofozoíto o movimento característico de uma “folha em queda” (Ford, 2005; House, Richter, Pham, & Dawson, 2011). Possuem também um corpo mediano e um disco ventral ou adesivo (Adam, 2001) (Figura 1). Estas estruturas e os flagelos conferem ao parasita uma forte capacidade de adesão aos enterócitos. Esta sua capacidade, aliada à sua grande mobilidade, evitam a sua eliminação pelo efeito do peristaltismo. Sendo fundamentais à sobrevivência do parasita, estas estruturas são alvo de alguns dos fármacos utilizados para tratar a infecção (Ankarklev et al., 2010; Carranza & Lujan, 2010).

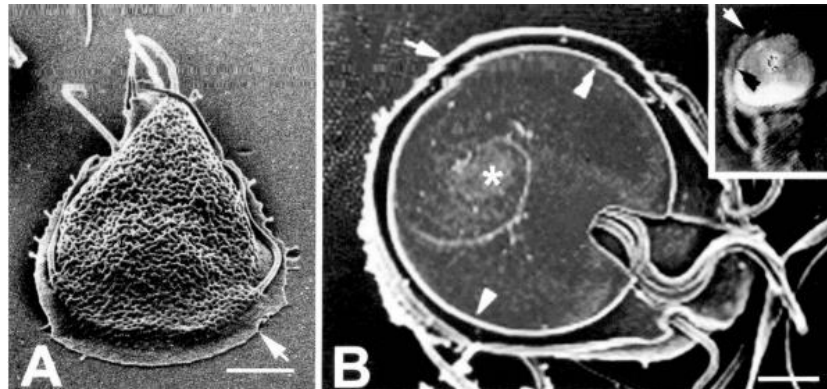
Figura 1 – Composição estrutural do citoesqueleto de *Giardia duodenalis*. Corte de microscopia eletrônica de varrimento (A); Vista dorsal (B) e lateral (C) de um trofozoíto em modelo 3D. Adaptado de The PLOS ONE Staff, 2014.



Legenda: AFL, flagelos anteriores; PFL, flagelos postero-laterais; VFL, flagelos ventrais; CFL, flagelos caudais; VD, disco ventral; N, núcleo; MB, corpo mediano; LC, crista lateral.

Os trofozoítos (Figura 4, a) têm dois núcleos ovais (Mehlhorn, 2016b), com os respectivos nucléolos (Ankarklev et al., 2010). Os núcleos são simétricos em relação ao eixo longitudinal, localizam-se na região anterior da célula (Coelho, Silva, Costa, & Fernandes, 2017) e estão associados ao retículo endoplasmático (Carranza & Lujan, 2010). Entre os núcleos passam longitudinalmente dois axonemas (Scorza & Lappin, 2012). No citoplasma também se identificam mitosomas centrais e periféricos, vesículas periféricas semelhantes a lisossomas, localizados sob a membrana plasmática, grânulos ribossomais e glicogénio (Adam, 2001; Coelho et al., 2017). Outras estruturas presentes são a crista lateral (Figura 1, A) e uma aba ventrolateral (Figura 2), podendo esta última ter um papel na virulência do parasita e na adesão ao epitélio intestinal (Erlandsen, Russo & Turner, 2004; House, Richter, Pham & Dawson, 2011; Midlej & Benchimol, 2009).

Figura 2 – Adesão do trofozoíto de *G. duodenalis* através da aba ventrolateral (setas) e disco ventral (pontas de setas). A aba ventrolateral circunda parcialmente o disco ventral, deixando de o fazer na região posterior onde o par de flagelos ventrais emerge (B). Imagens de microscopia eletrônica de varrimento. Adaptado de Erlandsen et al., 2004.



O quisto (Figura 3 e 4, b) é a forma infetante, responsável pela transmissão, e é resistente no meio ambiente (Sulaiman & Cama, 2006). Este apresenta uma forma oval a elipsoidal, não tem mobilidade e mede 8 a 15 μm em comprimento e 7 a 10 μm em largura. A parede do quisto tem uma espessura de 0,3 a 0,5 μm . É composta por uma camada externa filamentosa e uma dupla camada interna membranosa, sendo constituída predominantemente por três proteínas: as proteínas da parede do quisto 1 (CWP1, do inglês *cyst wall protein 1*), CWP2 e CWP3 (Adam, 2001; Erlandsen, Macechko, Keulen, & Jarroll, 1996; ESCCAP, 2018). O quisto, quando maduro, contém 4 núcleos, axonemas, vesículas periféricas, fragmentos dos discos ventrais e porções dos flagelos (Adam, 2001; Sheffield & Bjorvat, 1977).

Figura 3 – Quistos de *Giardia* spp. Imagem de microscopia eletrônica de varrimento. Adaptado de Erlandsen et al., 2004.

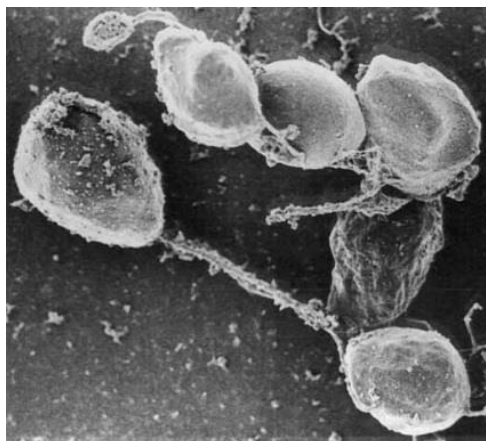
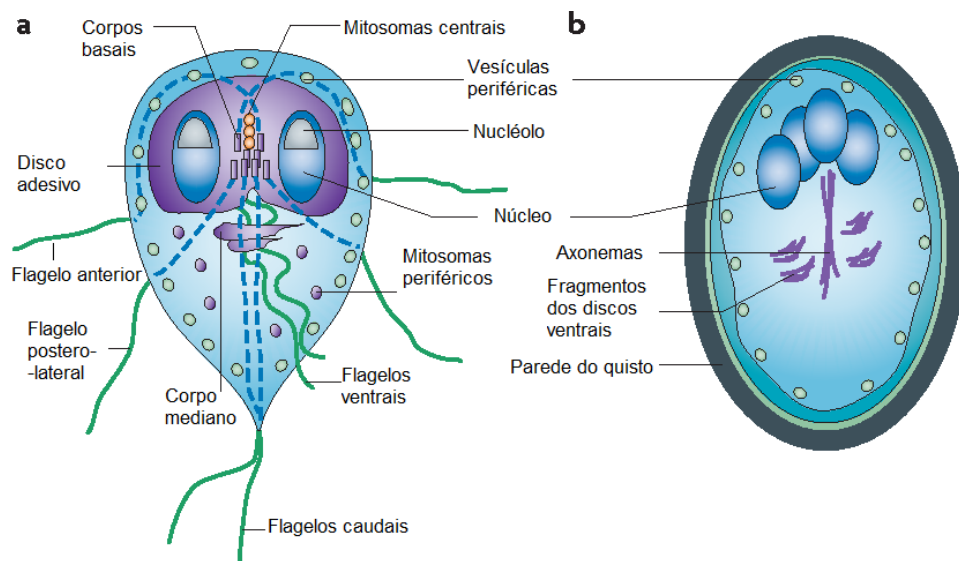


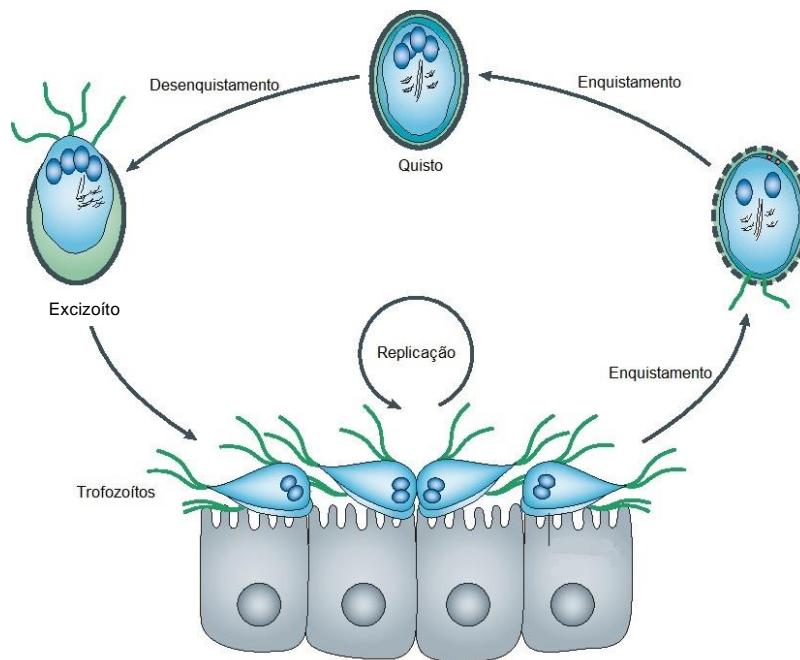
Figura 4 – Representação esquemática do trofozoíto (a) e do quisto (b) de *G. duodenalis*. Adaptado de Ankarklev et al., 2010.



4.2. Ciclo biológico de *Giardia duodenalis*

G. duodenalis tem um ciclo de vida direto (Figura 5), no qual ocorre a replicação de trofozoítos no intestino delgado e a produção intermitente de quistos, excretados nas fezes. O período pré-patente é de 4 a 16 dias e o período patente normalmente tem a duração de semanas a meses (ESCCAP, 2018).

Figura 5 – Ciclo de vida de *Giardia duodenalis*. Adaptado de Ankarklev et al., 2010.



Após a ingestão dos quistos, estes são expostos ao ácido gástrico, durante a passagem pelo estômago do hospedeiro, e às enzimas pancreáticas no duodeno, o que vai estimular o seu

desenquistamento (Adam, 2001; Ankarklev et al., 2010; Scorza & Lappin, 2012). É no duodeno que se inicia este rápido processo de diferenciação celular, que tem uma duração de apenas 15 minutos. Os quistos diferenciam-se em excizoítos, um estadio de vida muito curto, que dá início à infecção e que vai dar origem aos trofozoítos (Buchel, Gorenflot, Chochillon, Savel, & Gobert, 1987; Hetsko et al., 1998). À medida que a parede do quisto é degradada pelas proteases das vesículas periféricas, forma-se uma abertura num dos polos por onde saem inicialmente os flagelos, e por fim o corpo do excizoíto (Ward et al., 1997). De seguida, o excizoíto sofre duas citocineses, sem a replicação do ácido desoxirribonucleico (ADN), dando origem a 4 trofozoítos com 2 núcleos diploides cada um (Bernander, Palm & Svärd, 2001). Os trofozoítos aderem à bordadura em escova do epitélio intestinal, onde se multiplicam por fissão binária (Mehlhorn, 2016b). Apesar da reprodução sexuada já ter sido sugerida em alguns estudos, outros referem que não existem provas suficientes para a tomar em consideração. No entanto, existe evidência da ocorrência ocasional de recombinação genética (Ankarklev et al., 2010; Logsdon, 2008), particularmente em circunstâncias onde a frequência de transmissão é elevada (Thompson & Ash, 2016).

Alguns trofozoítos permanecem livres no lúmen intestinal e à medida que vão migrando até ao cólon, ocorre o processo de enquistamento (Ballweber et al., 2010), induzido pela sua exposição aos elevados níveis de biliar, baixos níveis de colesterol e ao pH básico (Lauwaet, Davids, Reiner, & Gillin, 2007). Este processo pode ser dividido em duas fases, durante as quais o parasita entra gradualmente num estado hipometabólico. Na fase inicial, os trofozoítos tornam-se mais arredondados e ocorre a formação das vesículas específicas de enquistamento (ESV, do inglês *encystation-specific vesicles*), que são responsáveis pela maturação e o transporte das CWP para a parede do quisto. Ocorre a internalização dos flagelos e a fragmentação do disco ventral em quatro estruturas, perdendo o parasita a sua capacidade de adesão. Sucede-se a replicação do ADN, dando origem a uma célula com 2 núcleos tetraploides. Durante a fase final do enquistamento, estes núcleos dividem-se e o ADN replica-se, originando quistos com 4 núcleos e uma ploidia de 16n (Ankarklev et al., 2010).

Normalmente, tanto os quistos como os trofozoítos podem ser encontrados nas fezes 5 a 7 dias após a infecção (Pitães & Carvalho, 2016). A excreção dos quistos ocorre predominantemente por picos esporádicos, e não ciclicamente, com um espaçamento de 2 a 7 dias entre cada pico, por um período de tempo indefinido. A excreção ocorre tanto em animais com ou sem sinais clínicos, de várias espécies (Uchôa, Sudré, Macieira, & Almosny, 2017), e inicialmente os quistos são excretados em grande quantidade. Uma vez que a excreção é intermitente, o número de quistos encontrados numa única amostra não é um bom indicador do nível de infecção (ESCCAP, 2018). Um estudo demonstrou que pode haver um aumento de 10 vezes no número de quistos recuperados em exames fecais realizados em 3 dias diferentes. Nesse estudo, a contagem do número de quistos por grama de fezes num cão

aumentou desde menos de 10 a 3.190 em 3 dias; e em outro cão aumentou dos 150 a 44.610 quistos por grama de fezes (Dryden, Payne, & Smith, 2006).

4.3. Biologia e morfologia de *Cryptosporidium* spp.

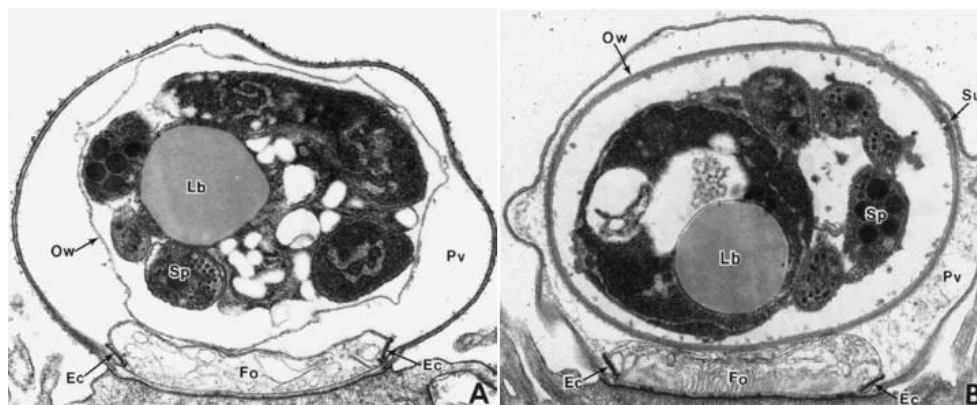
Tal como *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. é um organismo eucariótico unicelular (Fayer, 2007) e, para além do metabolismo anaeróbico, apresenta também o metabolismo aeróbico. As capacidades de biossíntese são bastante limitadas, possuindo por isso uma grande variedade de transportadores de forma a obter os nutrientes através da célula do hospedeiro (Xu et al., 2004).

Cryptosporidium spp. possui vários estadios de desenvolvimento diferentes ao longo do seu ciclo biológico: os oocistos, os esporozoítos, os trofozoítos, os merozoítos, os microgamontes, os microgâmetas, os macrogamontes e os zigotos.

O oocisto (Figura 6) é a forma infetante e de resistência no meio ambiente, responsável pela disseminação da infeção (Bowman, 2014). Este contém quatro esporozoítos esporulados, sem esporocistos, e um corpo residual (Smith, Nichols, & Grimason, 2005). A sua forma é oval a esférica e as suas dimensões variam consoante a espécie, tendo o oocisto de *C. canis* uma dimensão de 5,0 µm x 4,7 µm (comprimento x largura). Relativamente às outras espécies reportadas no cão, os oocistos de *C. parvum* e de *C. muris* têm uma dimensão de 5,0 µm x 4,5 µm e de 7,0 µm x 5,0 µm, respetivamente (Mehlhorn, 2016b).

A parede do oocisto é uma estrutura trilaminar, ligeiramente espessa (cerca de 49 nm) e incolor. A camada exterior tem uma espessura irregular com cerca de 10 nm e pensa-se que tenha uma natureza glicoproteica. Já a camada interna é linear e filamentosa, e é composta por uma região exterior com uma espessura de 11,6 nm e uma região interior com uma espessura de 25,8 nm. Entre as duas camadas existe uma fina camada central eletro-lucente com uma espessura média de 2,5 nm. Pensa-se que esta última seja constituída por um glicolípido ou uma lipoproteína, que confere alguma rigidez e a propriedade de álcool-ácido resistência do oocisto. A parede do oocisto é contínua, exceto num dos polos, onde é interrompida por uma sutura longitudinal que ocupa um terço a metade do seu comprimento, e é através desta que o esporozoíto emerge durante o processo de desenquistamento. Os oocistos de parede fina, diferem dos de parede espessa na medida em que não contêm uma camada interna espessa com várias regiões (Fayer, 2007).

Figura 6 – Oocistos de *Cryptosporidium* spp. de parede fina (A) e de parede espessa (B) em corte; imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Adaptado de Fayer, 2007.



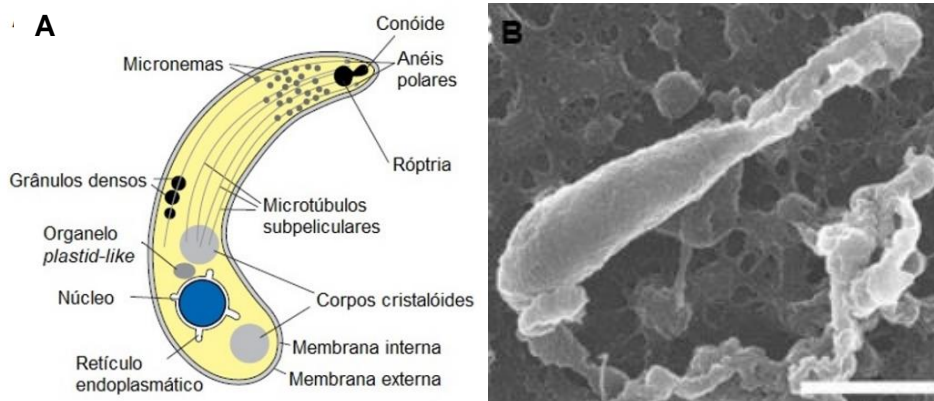
Legenda: Ow, parede do oocisto; Fo, organelo alimentador; Lb, corpo lipídico; Sp, esporozoíto; Pv, vacúolo parasitóforo; Su, sutura.

O esporozoíto (Figura 7) é o estadio móvel responsável pela adesão e invasão à célula hospedeira. Tem o formato de uma vírgula invertida e uma dimensão que varia entre os 3,8 a 5,2 μm em comprimento e 0,6 a 1,2 μm em largura. Os esporozoítos são bastante vulneráveis no meio intestinal, apesar de o muco poder conferir alguma proteção (Smith et al., 2005).

Esta estrutura apresenta um complexo apical, característico dos parasitas do filo Apicomplexa, que é constituído pelos anéis polares apicais, pelo conóide, e pelos organelos envolvidos na invasão: a róptria, os micronemas e os grânulos densos. Possui também, um aparelho de Golgi, um núcleo oval, um nucléolo e um retículo endoplasmático, localizados centralmente. Posteriormente ao núcleo, existem os corpos cristalóides, dos quais se desconhece a função, e entre estes está um organelo semelhante a uma mitocôndria (*plastid-like*). Este não contém as típicas cristas tubulares e assemelha-se ao reduzido núcleo das algas *Cryptomonas*, que parasitam hospedeiros unicelulares (Fayer, 2007; Smith et al., 2005).

Os esporozoítos apresentam um movimento flexível, helicoidal e sem direção específica. Os microtúbulos, que estão associados aos anéis polares e se estendem desde o ápex a meio do corpo do esporozoíto, são importantes para o seu movimento, invasão e conferem-lhe a sua forma (Smith et al., 2005).

Figura 7 – Esporozoíto de *Cryptosporidium* spp; representação esquemática (A) e imagem de microscopia eletrônica de varrimento (B). Adaptado de Smith et al., 2005 (A) e Koh et al., 2014 (B).



Os trofozoítos (Figura 8, A) são estruturas arredondadas com um diâmetro aproximado de 1,5 a 2,5 μm , que contêm um núcleo, um nucléolo proeminente e um organelo alimentador bem desenvolvido (Fayer, 2007).

Os merozoítos (Figura 8, B) desenvolvem-se na margem interior do meronte (Figura 9, A), sendo estruturalmente e biologicamente semelhantes aos esporozoítos (Cacciò & Putignani, 2014). Quando maduros, os merozoítos separam-se do resíduo ao qual estavam aderidos na extremidade posterior do meronte, a membrana da célula hospedeira que estava a rodear o meronte sofre lise e os merozoítos tornam-se extracelulares, prontos a infetar outras células (Fayer, 2007).

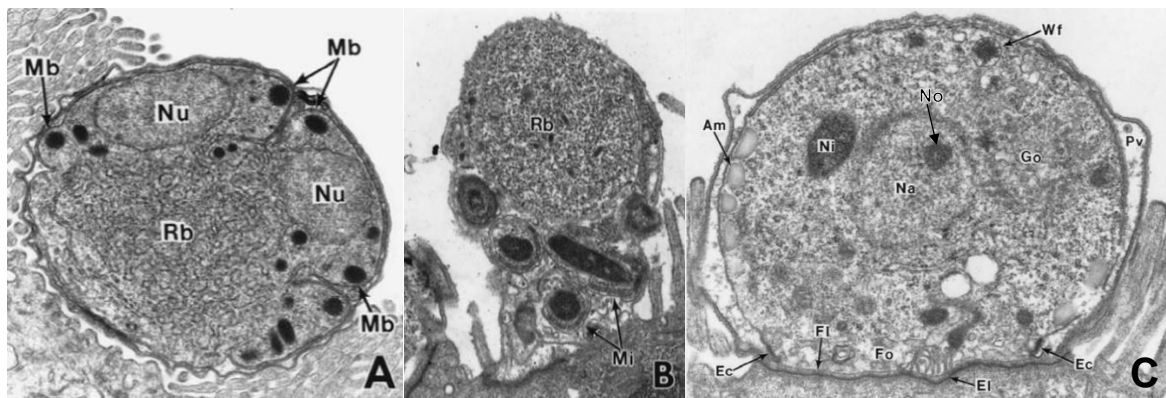
Figura 8 – Trofozoíto (A) e merozoíto de *Cryptosporidium* spp. no estadio inicial da adesão à célula epitelial (B); imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Adaptado de Fayer, 2007.



Legenda: Ec, colar eletro-denso; Ai, invaginação anterior; El, camada eletro-densa; Mn, micronemas; Nu, núcleo; No, nucléolo; Ph, plasmalema da célula hospedeira; Pv, vacúolo parasitóforo.

Os microgamontes imaturos assemelham-se aos merontes (Figura 9, A), mas contêm núcleos mais pequenos e compactos. Os microgâmetas formam-se a partir do corpo residual como uma protusão nuclear na superfície do microgamonte, zona na qual a sua membrana se torna mais espessa (Figura 9, B). Quando os microgâmetas se tornam maduros, separam-se do corpo residual que é rodeado por uma membrana simples e que contém ribossomas, um retículo endoplasmático e alguns micronemas. Os microgâmetas têm o formato de bastonete, são rodeados por uma membrana celular e contêm um núcleo condensado, oito microtúbulos que se estendem do polo anterior ao posterior, grânulos densos, com função desconhecida, e uma capa apical no polo posterior. Os macrogamontes (Figura 9, C) são estruturas eféricas a ovóides, contêm um núcleo central grande com um nucléolo proeminente, corpos lipídicos, grânulos de amilopectina e um corpo de formação da parede (do inglês, *wall-forming body*) (Fayer, 2007).

Figura 9 – Meronte na fase inicial da formação dos merozoítos, acima de cada polo dos dois núcleos (A); Microgamonte maduro onde são visíveis seis microgâmetas separados do corpo residual (B); Macrogamonte contendo o núcleo de um microgâmeteta (C); imagens de microscopia eletrónica de transmissão. Adaptado de Fayer, 2007.

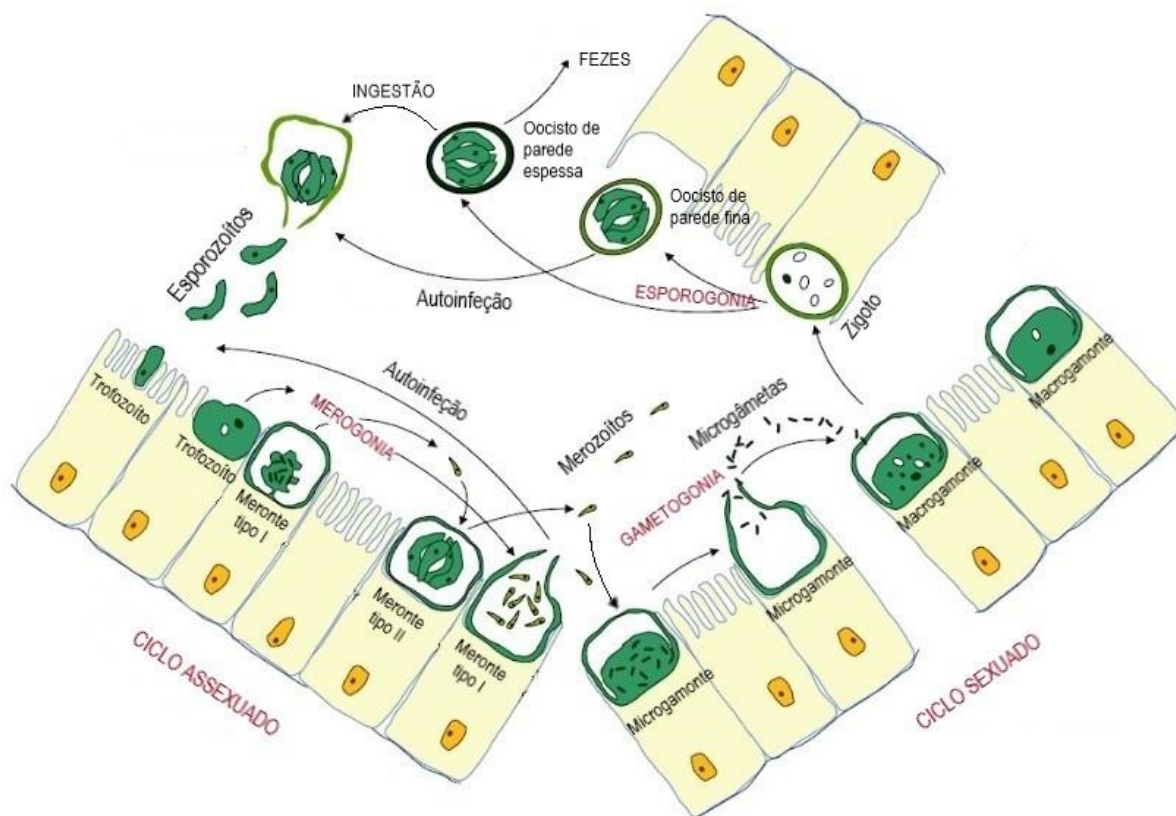


Legenda: Mb, merozoíto em desenvolvimento; Nu, núcleo; Rb, corpo residual; Mi, microgâmetas maduros; Am, grânulos de amilopectina; Ec, colar eletro-denso; Fo, organelo alimentador; Go, complexo de Golgi; Na, núcleo do macrogamonte; Ni, núcleo do microgâmeteta; No, nucléolo do macrogamonte; Pv, vacúolo parasitóforo; Wf, corpo de formação da parede.

4.4. Ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp.

O ciclo de vida deste protozoário é monoxeno (Figura 10) e envolve reprodução sexuada e assexuada (Ryan & Hijjawi, 2015). O período pré-patente de *C. canis* é de 2 a 14 dias e o período patente pode prolongar-se entre 25 a 80 dias (ESCCAP, 2018).

Figura 10 – Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. Adaptado de Cacciò & Putignani, 2014.

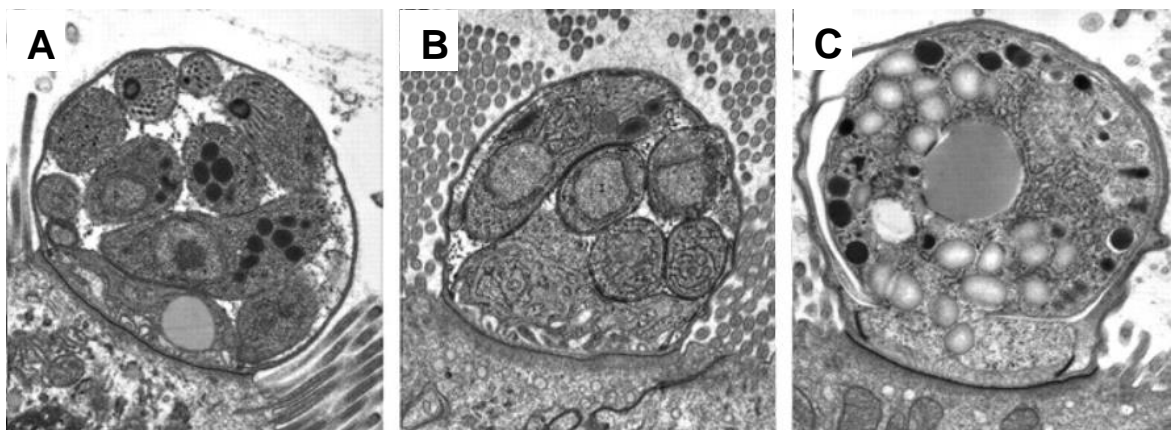


Após a ingestão dos oocistos, a primeira etapa para a infecção é o desenquistamento, o processo pelo qual a parede do oocisto se abre ao longo da sua sutura, ocorrendo a libertação de quatro esporozoítos infetantes. Este processo ocorre perante a exposição dos oocistos a vários estímulos como o pH ácido do estômago, a transição para o pH alcalino do intestino delgado, a temperatura corporal e os ácidos biliares. As espécies que infetam o estômago (como *C. muris*) respondem mais rapidamente ao estímulo do pH, uma vez que é necessária a libertação rápida dos esporozoítos após a ingestão de forma a ocorrer logo a infecção no estômago. Assim, a importância dos vários estímulos durante o desenquistamento varia consoante as diferentes espécies de *Cryptosporidium* (Cacciò & Putignani, 2014).

De seguida, ocorre a adesão e a invasão dos esporozoítos aos enterócitos, tendo o complexo apical um papel importante nesta etapa. Quando o esporozoíto entra em contacto com a célula hospedeira, a rópria estende-se até ao local de adesão e os micronemas e os grânulos densos deslocam-se para a região apical. O conteúdo dos organelos secretores é libertado, o que leva ao reconhecimento, à adesão e à invasão da célula hospedeira e à formação do vacúolo parasitário, dentro do qual o parasita se multiplica. Interações na interface parasita-célula culminam na formação do organelo alimentador, que apesar de fazer a separação direta entre a célula hospedeira e o parasita, é essencial à sua sobrevivência, uma vez que é a principal via de acesso aos nutrientes do citoplasma da célula hospedeira. À medida que o processo de internalização progride, o esporozoíto diferencia-se num trofozoíto esférico. O

trofozoíto reproduz-se assexuadamente por merogonia, através de divisões mitóticas, dando origem, sequencialmente, a dois tipos de merontes. Os merontes tipo I (Figura 11, A) contêm 6 ou 8 núcleos, sendo que cada um vai originar um merozoíto (Cacciò & Putignani, 2014). Pensa-se que este tipo de merontes têm a capacidade de se reciclar indefinidamente, havendo o potencial de se formarem novos merontes tipo I continuamente. Num período de 24 horas, os merozoítos maduros abandonam os merontes tipo I e invadem outras células epiteliais, onde se desenvolvem em mais merontes tipo I ou em merontes tipo II. Os merontes tipo II (Figura 11, B) contêm 4 núcleos e os 4 merozoítos gerados ao invadirem novas células hospedeiras iniciam a fase de reprodução sexuada, ao diferenciarem-se nos estádios de reprodução sexuada, os microgamontes e os macrogamontes (Scorza & Lappin, 2012). Através de divisões nucleares nos microgamontes, produzem-se numerosos microgâmetas que após serem libertados da superfície do gamonte e do vacúolo parasitóforo, vão fertilizar os macrogamontes. O processo de fertilização é rápido, onde ocorre a adesão dos microgâmetas através da sua capa apical à superfície da célula onde se encontra o macrogamonte, a passagem através das suas membranas, a entrada no seu citoplasma e a fusão dos núcleos (Fayer, 2007). O resultado da fusão destes dois gâmetas (gametogonia) culmina com a produção de um zigoto (Figura 11, C) (Cacciò & Putignani, 2014).

Figura 11 – Meronte tipo I com oito merozoítos (A); Meronte tipo II com quatro merozoítos (B); Macrogamonte fertilizado ou zigoto (C), imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Adaptado de Akiyoshi, Dilo, Pearson, Chapman, Tumwine & Tzipori, 2003.



Por fim, dá-se a esporogonia que consiste na divisão assexuada do zigoto, originando um oocisto com quatro esporozoítos infetantes. Deste processo tanto podem formar-se oocistos de parede espessa, como oocistos de parede fina. Após esta diferenciação, os oocistos soltam-se do epitélio intestinal, ficando livres no lúmen intestinal (Cacciò & Putignani, 2014). Durante a esporogonia, em cerca de 20% dos oocistos ocorre uma falha na formação da parede do oocisto, originando os oocistos de parede fina, constituída apenas por várias membranas. Este oocisto rutura e liberta de imediato os esporozoítos no lúmen intestinal, que

vão invadir novos enterócitos e recomeçar todo o ciclo de desenvolvimento. Os oocistos de parede espessa são eliminados juntamente com as fezes no meio ambiente, onde são imediatamente infectantes para outros hospedeiros suscetíveis. Assim, *Cryptosporidium* spp. parece ter dois ciclos de autoinfecção: o primeiro, através da renovação contínua dos merontes tipo I; o segundo, através dos esporozoítos libertados dos oocistos de parede fina (Scorza & Lappin, 2012).

Até recentemente, pensava-se que *Cryptosporidium* spp. era um parasita intracelular obrigatório. No entanto, em 2004, Hijjawi et al. descreveram pela primeira vez o desenvolvimento completo deste protozoário numa cultura axénica (sem células hospedeiras). Estudos subsequentes vieram corroborar esta descrição e confirmar a presença de todos os estádios de desenvolvimento e a produção dos dois tipos de oocistos em culturas axénicas. Mesmo quando *Cryptosporidium* spp. é cultivado num meio de cultura com células hospedeiras, este torna-se cada vez mais extracelular ao longo do seu ciclo biológico, sem evidência de adesão às linhas celulares. Outro estudo que utilizou a técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) quantitativo para avaliar o crescimento de *Cryptosporidium* spp. tanto numa cultura celular como numa cultura axénica, reportou que a maioria do DNA do parasita foi encontrado livremente no meio de cultura e apenas cerca de 5% estava associado às células ou ao plástico das caixas de Petri. Esta capacidade de completar o ciclo a nível extracelular, confirma a sua relação filogenética com as gregarinas, e neste caso, com as gregarinas celómicas que sobrevivem mesmo sem a sua adesão ao intestino do hospedeiro (Ryan, Paparini, et al., 2016). Parece, portanto, que *Cryptosporidium* spp. tem a capacidade de completar o seu ciclo biológico tanto a nível intracelular como extracelular, simultaneamente no mesmo hospedeiro, permitindo assim a produção massiva de oocistos (Thompson & Ash, 2016).

A presença de estádios extracelulares do tipo gamonte (*gamont-like stages*) também tem sido reportada por vários investigadores (Ryan & Hijjawi, 2015), sendo sugerido que estes se podem originar de esporozoítos cuja penetração na célula hospedeira falhou e que se diferenciam, posteriormente, em trofozoítos a nível extracelular (Hijjawi et al., 2004).

Para além dos mecanismos de reprodução já conhecidos, foi descrito outro mecanismo característico das gregarinas, a sizígia, que consiste no acoplamento de dois trofozoítos maduros dando origem a um gametócito (Ryan, Paparini, et al., 2016). Em vários estudos sobre *Cryptosporidium* spp., foi reportada sizígia em vários estádios, incluindo entre merozoítos tipo I/II, entre trofozoítos extracelulares e entre microgâmetas extracelulares; sizígia lateral entre trofozoítos ou esporozoítos e sizígia latero-caudal entre estádios extracelulares ou gamontes (Koh, Thompson, Edwards, Monis, & Clode, 2014). Recentemente também foi descrita a capacidade que os esporozoítos/zoítos têm, em certas circunstâncias, de se diferenciarem diretamente em estádios de reprodução sexuada, sem sofrerem merogonia. Esta plasticidade no ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp., com a capacidade de

contornar a merogonia e iniciar a divisão mitótica em esporozoítos acoplados, é outra das várias características que este protozoário tem em comum com as gregarinas (Aldeyarbi & Karanis, 2016).

5. Epidemiologia

Giardia e *Cryptosporidium* são parasitas ubiqüitários e ambos são causadores de doença com um impacto significativo, tanto em animais como nos humanos. Afetam principalmente animais jovens, em más condições sanitárias, sendo *Cryptosporidium* um dos principais agentes da diarreia neonatal em ruminantes, levando a perdas económicas devido a atrasos no crescimento, perda de peso, redução na produtividade e mesmo alguma mortalidade. Um estudo realizado no noroeste de Portugal registou uma prevalência da infeção por *Cryptosporidium* spp. de 89% em vitelos com idades entre os 7 e 14 dias, de 90% em vitelos com idades entre os 15 e 21 dias (90%) e de 74,8% em vitelos até 12 semanas de idade (Martins, Sousa, Madeira de Carvalho, Bacelar e Cannas da Silva, 2007). Outro estudo realizado em várias explorações leiteiras de Portugal, obteve uma prevalência global de *Cryptosporidium* spp. de 71,8% (Pereira da Fonseca, 2000).

Relativamente aos humanos, as infeções por estes dois protozoários têm um maior impacto nas crianças, nas grávidas, nos idosos, nos indivíduos imunocomprometidos, em comunidades desfavorecidas e nos países em desenvolvimento. Por estarem associadas a condições de pobreza e representarem um forte entrave ao desenvolvimento socio-económico nestes países, a giardiose e a criptosporidiose foram incluídas na Iniciativa das Doenças Negligenciadas da OMS (Ortega-Pierres, Smith, Cacciò, & Thompson, 2009; Thompson & Ash, 2016).

Ambos os parasitas são importantes agentes causadores de surtos associados à ingestão de água (Ortega-Pierres et al., 2009), sendo *Giardia* spp. considerado o agente mais frequente. A infeção por *Giardia* é a causa principal de diarreia de origem parasitária, tendo uma prevalência global de 2% nos adultos e 6 a 8% nas crianças em países desenvolvidos, e de cerca de 33% em países em desenvolvimento (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2015). Já a infeção por *Cryptosporidium* tem uma prevalência de 1 a 4% na Europa e América do Norte e de 3 a 20% em África, Ásia, Austrália, América Central e do Sul (WHO, 2006). Em Portugal as prevalências registadas para *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. são, respetivamente, de 6,8% em crianças do distrito de Lisboa e de 8% em doentes com SIDA (Júlio et al., 2012; Matos, Tomás, Aguiar, Casemore, & Antunes, 1998).

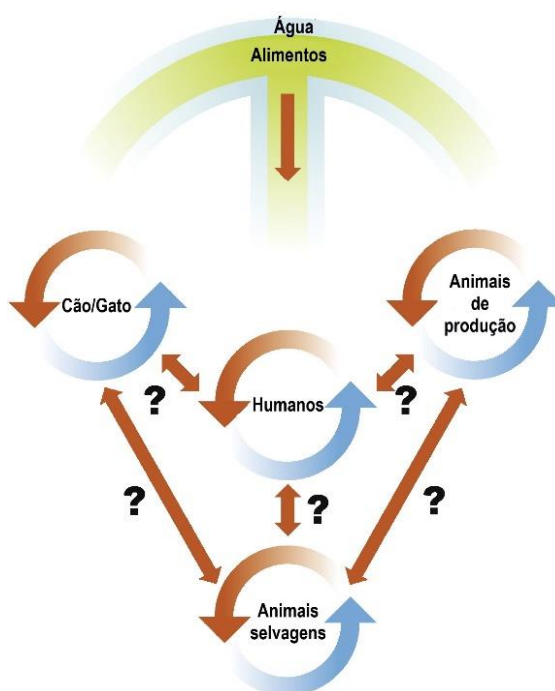
5.1. Transmissão

Giardia duodenalis e *Cryptosporidium* spp. são transmitidos por via fecal-oral, diretamente entre hospedeiros, ou indiretamente através da ingestão de quistos ou oocistos presentes na água, comida, fómites ou ambientes contaminados. Os cães podem reinfetar-se durante a sua

higiene, ao lambem o pelo da região perianal (ESCCAP, 2018; Papini, Gorini, Spaziani, & Cardini, 2005).

Existem vários fatores epidemiológicos que contribuem para a ubiquidade, persistência, fácil disseminação e reinfeção por estes dois parasitas, tais como: i) os quistos e oocistos serem imediatamente infetantes após a sua excreção, apesar de haver a evidência de alguns quistos se poderem tornar infetantes após um período de maturação de 7 dias (*The Center for Food Security & Public Health* [CFSPH], 2012); ii) a dose infetante ser muito baixa, sendo de 1 a 10 quistos nos bovinos e de 10 quistos e oocistos nos humanos; a dose infetante nos cães não é conhecida (Ankarklev et al., 2010; Zajac & Lindsay, 2004); iii) a excreção de uma grande quantidade de quistos e oocistos por parte de alguns hospedeiros infetados, como os bovinos (Scorza & Lappin, 2012); iv) os portadores com ausência de sinais clínicos poderem excretar quistos de *Giardia* por períodos de tempo mais longos (Uchôa et al., 2017); v) a sua grande capacidade de sobrevivência no ambiente até vários meses em condições ambientais frias e húmidas, apesar da sua suscetibilidade à dissecação e a condições de gelo-degelo (ESCCAP, 2018); vi) a existência de mecanismos de adaptação que permitem *Giardia* sobreviver dentro e fora do hospedeiro, como a variação antigénica e o enquistamento associado à redução da taxa metabólica dos quistos, respetivamente (Carranza & Lujan, 2010); vii) o facto de os estádios extracelulares de *Cryptosporidium* terem a capacidade de sobreviver e de se multiplicarem em biofilmes artificiais, o que pode representar um risco para a saúde pública se estes apresentarem a mesma capacidade em biofilmes presentes na água dos sistemas de abastecimento público; viii) os biofilmes representarem um reservatório potencial de oocistos e o facto de estes serem resistentes à maioria dos desinfetantes, incluindo às concentrações de cloro utilizadas nos sistemas de abastecimento de água pública, o que pode levar à ocorrência de surtos de criptosporidiose (Ryan, Paparini, et al., 2016); ix) a capacidade de autoinfeção de *Cryptosporidium* spp. que permite a persistência do agente no hospedeiro infetado (Ryan & Hijjawi, 2015); x) a existência de vários ciclos de transmissão (Figura 12), com ciclos independentes para as espécies específicas para um hospedeiro, assim como ciclos que interagem entre si quando se trata de espécies com uma baixa especificidade de hospedeiro, incluindo as espécies zoonóticas; a frequência da interação entre os vários ciclos é desconhecida, mas é exacerbada pela transmissão através da água e da comida (Thompson & Ash, 2016); xi) e o tratamento não ser, muitas vezes, 100% eficaz (*Companion Animal Parasite Council* [CAPC], 2017, 2018).

Figura 12 – Ciclos de transmissão de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. Adaptado de Thompson & Ash, 2016.



Legenda: ?, frequência de transmissão desconhecida.

5.2. Prevalência

Os parasitas do género *Giardia* são, muitas vezes, os endoparasitas mais frequentes no cão (Bowman & Lucio-Forster, 2010; Thompson & Ash, 2016), apresentando uma prevalência global de 15,2%, de acordo com uma revisão sistemática e uma meta-análise de vários estudos a nível mundial (Bouzid et al., 2015). No entanto, a prevalência pode variar entre os 10% nos cães de clínica, 30 a 50% nos cachorros e os 100% nos cães de abrigos ou canis de criação (Rishniw, Liotta, Bellosa, Bowman, & Simpson, 2010). Relativamente ao género *Cryptosporidium*, apesar da informação limitada sobre a prevalência da infeção no cão, vários estudos a nível mundial apontam para valores entre os 0% e os 44,8% (Bowman & Lucio-Forster, 2010; Zajac & Lindsay, 2004).

Em Portugal, as prevalências de *Giardia duodenalis* registadas foram de 1,3% na região do Grande Porto, 4,2% no distrito de Bragança e 15,5% no distrito de Évora, em cães de clínica (Ferreira et al., 2011; Leal, 2015; Neves, Lobo, Simões, & Cardoso, 2014). Em cães de canil, foram registadas prevalências de 23,7% no distrito de Bragança, 47% no distrito de Évora e 55,9% na cidade de Lisboa (Ferreira et al., 2011; Leal, 2015; Lebre, 2011).

Já a prevalência estimada para *Cryptosporidium* spp. ronda os 3,1% no distrito de Bragança e os 17,6% na cidade de Lisboa, em cães de canil (Leal, 2015; Lebre, 2011), e os 0 a 12% em cães de clínica e/ou de ambiente doméstico (Ferreira, 2015; Leal, 2015).

A prevalência destes parasitas varia substancialmente de estudo para estudo devido às diferenças na idade, origem, condição clínica da amostra populacional estudada e altura do

ano, sendo mais elevada em animais com menos de um ano de idade, em ambientes com uma grande densidade populacional e em animais com sinais clínicos. No entanto, o fator que condiciona preponderantemente a prevalência é o método de diagnóstico utilizado devido às diferenças de sensibilidade (Bouzid et al., 2015; Epe, Rehker, Schnieder, Lorentzen, & Kreienbrock, 2010; Gracenea, Gómez, & Torres, 2009).

5.3. Importância zoonótica

O risco de transmissão zoonótica de *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. entre animais de companhia (principalmente cães) e humanos tem sido uma preocupação de saúde pública ao longo dos anos, mas que ainda não está completamente elucidado. A análise deste risco é feita, normalmente, através da genotipagem molecular dos parasitas isolados, com recurso a vários marcadores genéticos. Apesar de vários estudos moleculares revelarem a presença de genótipos e espécies potencialmente zoonóticas nos cães, estes estudos por si só não permitem obter respostas conclusivas sobre a dinâmica da transmissão zoonótica. Inclusivamente podem obter-se conclusões parciais ou incorretas uma vez que existe a possibilidade da existência de zoonose reversa (zooantroponose), o potencial não reconhecido de os animais de companhia agirem como portadores passivos de oocistos de origem antroponótica e a falta de dados moleculares a nível dos sub-genótipos/subtipos (Ballweber et al., 2010; Cacciò et al., 2017; de Lucio et al., 2017). Assim o entendimento do potencial de transmissão zoonótica deve basear-se em estudos abrangentes que englobem dados biológicos, moleculares e epidemiológicos. O tipo de estudo ideal para demonstrar conclusivamente a transmissão zoonótica são os estudos longitudinais conduzidos a nível comunitário, nos quais se realiza a genotipagem em múltiplos *loci* em todas as amostras positivas de cães e pessoas no mesmo espaço temporal e espacial. Como estes estudos são dispendiosos e difíceis de implementar, os estudos transversais ou baseados em casos esporádicos são a informação normalmente disponível. No entanto, deve ter-se em conta que os resultados destes estudos são difíceis de comparar devido às diferenças na metodologia, principalmente no que diz respeito ao tipo e número de marcadores genéticos utilizados, aos métodos de extração de ADN e às condições da técnica de PCR (Ballweber et al., 2010; de Lucio et al., 2017; Thompson & Ash, 2016).

A infeção por *Giardia duodenalis* nos humanos é causada geralmente pelos *assemblages* A e B, enquanto nos cães é principalmente causada pelos *assemblages* específicos caninos, C e D. No entanto, o *assemblage* A e, ocasionalmente, o B também já foram identificados na espécie canina, existindo assim um potencial zoonótico (Ballweber et al., 2010; ESCCAP, 2018). Também já foram reportados casos de infeção nos humanos pelos *assemblages* C e D (Cacciò et al., 2017). Apesar de numerosos estudos, através da aplicação de técnicas moleculares, demonstrarem a infeção das pessoas e dos seus cães com o mesmo *assemblage*, estes não demonstraram a ocorrência da transmissão zoonótica. Algumas

evidências desta transmissão foram sugeridas em estudos realizados em áreas endêmicas bem definidas, em comunidades carentes em vários locais do mundo, onde existem baixos níveis de higiene e um estreito contacto entre cães e pessoas. Estes estudos demonstraram também a ocorrência da transmissão zoonótica, entre os humanos e os animais selvagens (Cacciò, Thompson, McLauchlin, & Smith, 2005; Thompson & Ash, 2016).

A caracterização genética de oocistos colhidos de amostras fecais de vários hospedeiros, revelou a ocorrência da infeção por diferentes espécies e genótipos de *Cryptosporidium* adaptados a cada espécie de hospedeiro. Por exemplo, normalmente as pessoas são infetadas por *C. hominis* e *C. parvum* e os cães por *C. canis* (Bowman & Lucio-Forster, 2010). Apesar de 90% dos casos de criptosporidiose humana estarem associados às espécies *C. hominis* e *C. parvum*, cerca de 20 espécies e genótipos de *Cryptosporidium* spp. já foram reportados, incluindo *C. canis*, tanto em indivíduos imunocompetentes como imunodeprimidos. Estudos moleculares revelaram que *C. hominis* parece ter uma especificidade estrita para os humanos, sendo a sua transmissão apenas antropónica. Estes estudos também identificaram vários subtipos familiares de *C. parvum*, tendo o subtipo familiar IIc uma transmissão antropónica e o subtipo familiar IIa e IIb uma transmissão zoonótica. Apesar de ser considerada uma espécie tipicamente zoonótica, muitas infeções por *C. parvum* em humanos não são resultado de transmissão zoonótica, mas sim antropónica. É o que acontece na maioria dos casos nos países em desenvolvimento, sendo o subtipo familiar IIc o responsável pela maioria das infeções por *C. parvum* (Ryan et al., 2014; Ryan & Hijawi, 2015). No entanto, nestes países a maioria das infeções é causada por *C. hominis* onde a via de transmissão predominante é a antropónica, o que se deve principalmente às deficientes condições sanitárias destes países (Bowman & Lucio-Forster, 2010; Chako, Tyler, Schultz, Chiguma, & Beerntsen, 2010). Já nos países europeus, tanto *C. hominis* como *C. parvum* têm uma distribuição equitativa (Khan, Shaik, & Grigg, 2017). Relativamente a *C. parvum*, tanto o subtipo IIa como IIc são bastante comuns, mantendo-se incerta a proporção de casos de infeção atribuíveis à transmissão zoonótica. No entanto, estudos realizados em Portugal, na Eslovénia e na Escócia, mostraram que a diversidade genética de *C. parvum* nos humanos era superior comparativamente à dos bovinos, o que sugere que uma grande parte das infeções não tem origem zoonótica, mas sim antropónica (Xiao, 2010). Relativamente ao papel dos cães como possível fonte de transmissão de *C. parvum*, o risco é mínimo a nulo, uma vez que nestes a infeção é refratária (Bowman & Lucio-Forster, 2010).

Relativamente à infeção por *Cryptosporidium canis* nos humanos, esta é reportada principalmente em crianças de países em desenvolvimento ou de comunidades de estatuto económico baixo e em pacientes com SIDA. A posse de animais domésticos demonstrou ser um fator de risco de criptosporidiose na Indonésia. Um estudo pequeno encontrou apenas uma fraca associação entre a posse de cães e criptosporidiose em pacientes com SIDA; já outro estudo demonstrou ser um fator protetor contra a criptosporidiose. Vários estudos

epidemiológicos em países desenvolvidos não mostraram uma associação estatisticamente significativa entre a posse de cães e a infecção por *Cryptosporidium* e nos casos em que *C. canis* foi identificado tanto nas fezes dos cães como dos seus tutores, não foi possível determinar a direção da transmissão (Bowman & Lucio-Forster, 2010; Chako et al., 2010). Mesmo nos países em desenvolvimento onde a prevalência de *C. canis* é superior, existe a possibilidade de ocorrer também a transmissão antroponótica. Esta possibilidade é sugerida por um estudo realizado no Perú em pacientes com SIDA, que revelou a infecção concomitante pelas espécies específicas dos humanos, *C. hominis* e *C. parvum* subtipo familiar IIc, com *C. canis* e *C. felis* em 6 dos 21 pacientes, o que sugere que alguns casos de infecção por estes dois últimos poderão ter sido adquiridas pela via antroponótica (Bowman & Lucio-Forster, 2010; Xiao & Fayer, 2008).

As infecções por *Cryptosporidium* spp. e *Giardia duodenalis* são consideradas zoonoses raras em circunstâncias económicas, sanitárias e de saúde normais, constituindo os cães um risco mínimo a nulo para a saúde pública da população geral, comparativamente a outros fatores de risco como: a utilização de águas recreativas, contacto com crianças, contacto com vitelos de leite, viagens para países com más condições de higiene ou de purificação das águas (Bowman & Lucio-Forster, 2010). A tese acima referida é também corroborada pelo facto de ter sido encontrada uma evidência nula ou limitada da transmissão zoonótica na maioria dos estudos realizados a nível comunitário, com uma amostra significativa (de Lucio et al., 2017).

6. Patogenia

Apesar de os mecanismos patogénicos (Figura 13) envolvidos na giardiose e criptosporidiose não serem completamente entendidos, estudos realizados *in vitro* e *in vivo* revelam que estes são multifatoriais. Estes mecanismos envolvem tanto fatores relacionados com o parasita como com o hospedeiro, desempenhando estes últimos um papel determinante no impacto clínico da doença (Certad, Viscogliosi, Chabé, & Cacciò, 2017; Scorza & Lappin, 2012b; Thompson & Ash, 2016).

6.1. Fatores parasitários

6.1.1. Adesão e invasão

A adesão é um fator crítico e um pré-requisito para o estabelecimento das infecções por *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. Como referido anteriormente, os trofozoítos de *Giardia duodenalis* aderem às células epiteliais através de uma estrutura especializada, o disco ventral, e dos flagelos (Certad et al., 2017). A demonstração de clones de *Giardia* que exibiam uma adesão deficiente e consequentemente uma capacidade reduzida de estabelecimento de infecção em gerbos da Mongólia, evidencia a importância do processo de adesão durante a infecção por *Giardia* (Ortega-Pierres et al., 2009).

A adesão de *Cryptosporidium* é mediada por proteínas expressas à sua superfície ou secretadas por vesículas do complexo apical, nomeadamente as glicoproteínas *mucin-like* e proteínas adesinas com domínios semelhantes à trombospondina (TRAP, do inglês *thrombospondin-related adhesive proteins*) (Smith et al., 2005).

Giardia é um parasita extracelular, não ocorrendo invasão, infeção sistémica ou penetração do epitélio intestinal. Já *Cryptosporidium*, apesar de ser intracelular, é minimamente invasivo pois não penetra nas camadas mais profundas da mucosa. Em indivíduos imunodeprimidos, a infeção por este protozoário pode também ocorrer nas células epiteliais do intestino grosso, trato biliar, ducto pancreático, estômago, esófago e trato respiratório (CAPC, 2017); no entanto estas localizações extraintestinais ainda não foram reportadas em animais de companhia (Zajac & Lindsay, 2004)

6.1.2. Remodelação do citoesqueleto, disrupção da barreira epitelial e perda da sua função

A infeção por *Giardia* provoca lesões funcionais nas microvilosidades intestinais que resultam na disrupção, redução da expressão e/ou desorganização das proteínas do citoesqueleto tais como a *zonula occludens* (ZO)-1, claudina-1, actina-F e actinina- α . Ocorre também uma atrofia vilosa e aumento da morte celular. Todos estes eventos levam à destruição da barreira epitelial que induz um aumento da permeabilidade intestinal e redução da resistência transepitelial, o que pode provocar o extravasamento de líquido paracelular e diarreia exsudativa; má digestão, má absorção e menor atividade da dissacaridase, causando uma diarreia osmótica. Estas alterações estão também associadas a uma diarreia secretória devido à hipersecreção de cloro (Buret, 2008; Certad et al., 2017).

Relativamente a *Cryptosporidium* spp., este induz a polimerização da actina e a remodelação do citoesqueleto. Estudos *in vitro* também reportaram a disrupção da ZO-1 e a fragmentação nuclear durante a infeção. Outras alterações que ocorrem são a atrofia vilosa e a hiperplasia das criptas intestinais, o que leva a uma má absorção e hipersecreção. Todos estes eventos que provocam uma diarreia de três origens diferentes, são semelhantes aos observados durante a giardiose (Certad et al., 2017; Ortega-Pierres et al., 2009).

6.1.3. Inflamação e resposta imunitária

A perda da barreira epitelial leva à ativação dos mecanismos imunomediados do hospedeiro, devido ao contacto dos antigénios do lúmen intestinal com os compartimentos intra ou subepitelial. A infeção por *Giardia* e *Cryptosporidium* desencadeia tanto uma resposta imune inata, como adaptativa. Ainda assim, os mecanismos envolvidos nestas respostas não são totalmente conhecidos e existem algumas diferenças entre os dois protozoários (Scorza & Lappin, 2012). Por um lado, a infeção por *Giardia duodenalis*, normalmente é acompanhada por baixos níveis de inflamação; isto pode ser explicado, em parte, pela sua fraca capacidade

de induzir a produção de citocinas, como pelas suas atividades anti-inflamatórias recentemente demonstradas, tais como a degradação da interleucina-8 (IL-8) por uma protease produzida pelo próprio parasita. Ocorre, no entanto, numa fase inicial, a ativação de vários mecanismos de defesa como o óxido nítrico (NO); as espécies reativas de oxigênio; as defensinas; as lactoferrinas; células imunitárias como fagócitos, mastócitos e células dendríticas; as quimiocinas, como a IL-17; um aumento no número de linfócitos T CD8+ e uma hiperplasia dos mastócitos, levando ao encurtamento das microvilosidades, ao agravamento da função da barreira epitelial, à hipermotilidade intestinal e ao déficit de dissacaridase (Fink & Singer, 2017). Numa fase tardia, uma resposta humoral, mediada pela imunoglobulina (Ig) secretora IgA, é responsável pela eliminação do parasita (Einarsson, Ma'ayeh, & Svärd, 2016).

Por outro lado, *Cryptosporidium* spp. induz uma forte resposta inflamatória intestinal com a secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas mediadas pelo fator nuclear κ B. No entanto, o fator transformador de crescimento- β (TGF- β) é secretado durante a infecção, desempenhando um papel anti-inflamatório e limitando a lesão epitelial. Os mediadores iniciais da imunidade inata incluem a camada de muco intestinal, as células epiteliais e as quimiocinas, citocinas e péptidos antimicrobianos secretados no lúmen intestinal, submucosa e corrente sanguínea. Citocinas importantes como o interferão- γ (IFN- γ), secretadas num estadio inicial por macrófagos e células dendríticas, contribuem de forma significativa para o desenvolvimento da resposta imunitária inata e adaptativa. Esta última é mediada por linfócitos *T-helper*, na qual os linfócitos T CD4+ produzem citocinas como o IFN- γ , IL-12, IL-15 e IL-18 que vão ser importantes na eliminação do parasita e na criação de memória imunológica. A ativação dos linfócitos T CD4+ e T CD8+ no compartimento intraepitelial contribui para um agravamento da permeabilidade epitelial, má absorção e hipersecreção intestinal. O papel da imunidade humoral na infecção por *Cryptosporidium* spp. requer mais investigação pois os mecanismos envolvidos ainda não são totalmente compreendidos (Ortega-Pierres et al., 2009; Ryan, Zahedi, & Paparini, 2016; Scorza & Lappin, 2012b).

6.1.4. Apoptose

Ambos os parasitas induzem a apoptose das células epiteliais. No entanto, *Cryptosporidium* spp. tem a capacidade de modular este evento celular, inibindo-o no estadio de trofozoíto e ativando-o nos estadios de esporozoíto e merozoíto. A apoptose é também favorecida pela resposta inflamatória do hospedeiro e pela expressão de genes pró-apoptóticos nas fases tardias da infecção. Esta complexa interação entre o hospedeiro e o parasita permite que, por um lado, o seu ciclo biológico se complete e por outro, desempenha um papel de proteção para o hospedeiro ao limitar a infecção (Certad et al., 2017).

6.1.5. Lesão celular

Para além das alterações descritas anteriormente, *Giardia duodenalis* secreta várias enzimas como a arginina deiminase (ADI), ornitina carbamoiltransferase (OCT), α -enolase e as caspases, que para além de poderem fazer parte de uma estratégia para escapar aos mecanismos de defesa mediados pelo óxido nítrico (NO), uma vez que competem pelo mesmo substrato, podem também afetar a permeabilidade intestinal, as células do sistema imunitário e induzir a apoptose (Ankarklev et al., 2010; Certad et al., 2017).

Já na infeção por *Cryptosporidium* spp. ocorre a libertação de lactato desidrogenase e a secreção de fosfolipases, proteases e hemolisinas. As proteases estão implicadas na degradação, invasão dos tecidos e evasão ao sistema imunitário do hospedeiro. As hemolisinas provocam alterações nas membranas celulares, sugerindo um papel na invasão ou disseminação dos merozoítos a outras células. Estas moléculas podem causar lesões celulares, acentuando a secreção de fluidos e a diarreia secretória e osmótica. Como consequência, dá-se um aumento da taxa de morte celular (Certad et al., 2017).

6.1.6. Fatores de virulência e diversidade genética

Giardia e *Cryptosporidium* dispõem de vários fatores de virulência, ou seja, componentes do parasita essenciais à sua viabilidade e que vão causar dano ao hospedeiro, contribuindo assim para a sua virulência. Os fatores de virulência de *Giardia duodenalis* incluem: i) componentes envolvidos na adesão; ii) motilidade flagelar; iii) variação antigénica através da variação da expressão das proteínas de superfície variáveis (VSP, do inglês *variant-specific surface protein*) à superfície do trofozoíto, o que permite a evasão ao sistema imunitário do hospedeiro; iv) produtos parasitários que suprimem a resposta imunitária inata e modificam a resposta inflamatória do hospedeiro e; v) a diferenciação em quistos, que permite a sobrevivência no estômago e no meio ambiente. Já os fatores de virulência de *Cryptosporidium* spp. envolvem: i) componentes relacionados com o desenquistamento, motilidade, adesão e invasão; ii) formação do vacúolo parasitóforo; iii) a capacidade de se manter a nível intracelular e; iv) a indução de lesões celulares (Ankarklev et al., 2010; Certad et al., 2017).

A variabilidade genética existente entre as diferentes espécies, genótipos e subtipos destes dois parasitas leva a algumas variações nos fatores de virulência, como é o caso dos diferentes repertórios de VSP expressos entre a estirpe WB e GS de *Giardia duodenalis*. Adicionalmente, vários estudos a nível mundial têm reportado diferenças na manifestação clínica consoante a espécie, genótipo ou subtipo envolvidos na infeção (Certad et al., 2017).

6.2. Fatores do hospedeiro

6.2.1. Sistema imunitário

O estado do sistema imunitário é um dos fatores mais determinantes no desenvolvimento e gravidade dos sinais clínicos. Na maioria dos cães imunocompetentes, a infecção por ambos os protozoários não apresenta sinais clínicos, enquanto cães jovens, imunodeprimidos ou com infecções concomitantes têm uma maior probabilidade de manifestar sinais clínicos e com maior gravidade. O estado nutricional dos animais também vai influenciar na manifestação da doença, no caso da infecção por *Giardia duodenalis* (ESCCAP, 2018; Raza, Rand, Qamar, Jabbar, & Kopp, 2018).

Relativamente a *Giardia duodenalis*, foi encontrada uma associação entre cachorros e a infecção, que poderá ser explicada, para além da imaturidade do sistema imunitário, pelo *stress* associado ao desmame, transporte e adaptação a uma nova casa (Neves et al., 2014). Cães sujeitos a um elevado nível de *stress*, como por exemplo, cães de trabalho, são também mais suscetíveis (ESCCAP, 2018). Vários estudos reportaram uma exacerbação da infecção por *Cryptosporidium* spp. em cachorros com imunossupressão secundária à infecção com o vírus da esgana (Riggs, 2018b). Outras comorbidades que podem levar à expressão clínica da infecção por *Cryptosporidium* spp., são o linfoma, a coinfeção com o parvovírus canino ou outros parasitas, como *Cystoisospora canis* (Scorza & Lappin, 2012; Zajac & Lindsay, 2004).

6.2.2. Interação com a microbiota intestinal

A composição da microbiota intestinal está associada a diferenças na suscetibilidade e patogenia da infecção (Certad et al., 2017). Para além disso, a interação que ocorre entre estes dois protozoários e a microbiota comensal provoca perturbações, como disbiose e aumento da sua virulência, o que pode levar a alterações na patologia e imunopatologia durante a infecção. A resposta imunitária e a composição da microbiota intestinal estão intimamente relacionadas, uma vez que esta influencia o desenvolvimento das células T. Por outro lado, a resposta imunitária modula a composição da microbiota através de vários mecanismos efetores como os péptidos antimicrobianos, muco, óxido nítrico e IgA's. Adicionalmente, a disbiose pode também contribuir para o fenómeno de má absorção observado durante a infecção e para a ocorrência de distúrbios intestinais crónicos compatíveis com a doença inflamatória intestinal (IBD, do inglês *inflammatory bowel disease*) (Fink & Singer, 2017; Scorza & Lappin, 2012).

(A)

Epitélio intestinal normal

Absorção de nutrientes

●● Junções intercelulares

(B)

Epitélio intestinal infectado

Cryptosporidium

Giardia

7. Diagnóstico

A doença provocada por *Giardia* e *Cryptosporidium* apresenta uma ampla variedade de manifestações clínicas (Ehsan et al., 2017), dependendo da idade, estado nutricional, estado imunitário e outras comorbidades ou coinfeções (Raza et al., 2018). Cães adultos imunocompetentes, normalmente não apresentam sinais clínicos ou apresentam uma diarreia auto-limitante (CAPC, 2017; CFSPH, 2012). *Giardia duodenalis* é, inclusivamente, na maioria das vezes um parasita comensal da flora intestinal dos cães (ESCCAP, 2018). Assim, a doença clínica é manifestada pelos animais com a imunidade mais comprometida, como os

animais jovens, animais malnutridos ou animais com outras infecções concomitantes (Mehlhorn, 2016b).

O sinal clínico mais consistente da giardiose é a diarreia, que pode ser aguda, crônica, intermitente ou constante, podendo levar a desidratação e desconforto abdominal (Ehsan et al., 2017; Raza et al., 2018). Esta geralmente começa cinco dias após a exposição ao parasita, aquando da excreção dos primeiros quistos (Bowman, 2014; CFSPH, 2012). As fezes normalmente são moles ou pastosas, com uma textura característica de “papa de aveia”, têm uma coloração clara, cheiro fétido, e, por vezes, apresentam muco e esteatorreia (Mehlhorn, 2016b). Tal como nos humanos, não se observa sangue nas fezes (Ballweber et al., 2010). Os animais podem apresentar um aspeto pouco saudável, anorexia, perda de peso ou ganho de peso inadequado e em casos mais graves, atraso no crescimento e caquexia. Outros sinais clínicos menos comuns são o vômito e a letargia (Hamnes, Gjerde, & Robertson, 2007).

Na criptosporidiose, os sinais clínicos principais são a diarreia e a desidratação (CAPC, 2017). A diarreia é caracterizada por ser aquosa, ter um mau odor, ter um grande volume, baixa frequência e cor amarelo-palha. A diarreia pode ser aguda, crônica ou intermitente, podendo ter uma duração de dias a semanas e está frequentemente associada a vômito, dor abdominal e hipertermia (ESCCAP, 2018; Scorza & Lappin, 2012a; Zajac & Lindsay, 2004). Em alguns casos crónicos é reportado hematoquézia, tenesmo, fraqueza e uma perda de peso significativa (Ehsan et al., 2017; Scorza & Lappin, 2012).

Cães infetados com *C. muris* manifestaram vômito crónico e diarreia profusa num estudo, enquanto em outro estudo nenhum sinal gastrointestinal foi observado (Ehsan et al., 2017).

Os sinais clínicos geralmente iniciam-se poucos dias após a exposição ao parasita devido ao seu curto período pré-patente e alguns dias após o início da excreção de oocistos (ESCCAP, 2018; Raza et al., 2018).

7.2. Diagnóstico laboratorial

Uma vez que os parâmetros hematológicos, bioquímicos e urinários dos animais infetados por *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. estão dentro dos limites de referência ou apresentam alterações inespecíficas decorrentes de desidratação ou alterações eletrolíticas associadas à diarreia, o seu diagnóstico baseia-se na sua deteção, em conjunto com a apresentação clínica do animal e a exclusão de outras causas de diarreia, tanto agudas como crónicas (Scorza & Lappin, 2012b; CFSPH, 2012). Os diagnósticos diferenciais incluem causas infecciosas e não infecciosas de diarreia do intestino delgado, causas de má absorção e digestão, doença inflamatória intestinal e insuficiência pancreática exócrina (Scorza, 2013). Para além das infecções subclínicas, o padrão de excreção intermitente nas fezes e o baixo número de quistos e oocistos excretados pelos animais de companhia são outras das características da infeção por *Giardia* e *Cryptosporidium* que tornam o seu diagnóstico

desafiante, sendo por isso frequentemente subdiagnosticadas e as suas prevalências subestimadas (Scorza & Lappin, 2012; Uchôa, Sudré, Campos, & Almosny, 2018).

Vários métodos de diagnóstico estão disponíveis para a detecção destes dois protozoários, incluindo a microscopia, os métodos imunológicos e moleculares (ESCCAP, 2018).

7.2.1. Técnicas de microscopia convencional

A microscopia é o método de diagnóstico tradicionalmente utilizado para o diagnóstico de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., por várias técnicas diferentes. Têm como vantagem ser técnicas eficazes, económicas e algumas permitem a detecção de outros helmintes e protozoários na mesma amostra (Koehler, Jex, Haydon, Stevens, & Gasser, 2014; Soares & Tasca, 2016). No entanto, são técnicas laboriosas, de identificação morosa e a sua sensibilidade varia consoante o número de amostras examinadas por cada animal, o número de quistos e oocistos em cada amostra, a técnica utilizada e a experiência do operador (Soares & Tasca, 2016; Van den Bossche, Cnops, Verschueren, & Van Esbroeck, 2015).

A microscopia pode apresentar uma sensibilidade reduzida nos casos em que o número de quistos e oocistos nas amostras fecais é baixo e devido aos resultados falsos-negativos provocados tanto pela frequente inexperiência dos veterinários na identificação microscópica, como pela intermitência na excreção. Para contornar a interferência deste último fator no diagnóstico, é recomendada a colheita de pelo menos três amostras fecais, durante um período de 3 a 5 dias, para aumentar a sensibilidade deste método (ESCCAP, 2018; Koehler et al., 2014; Soares & Tasca, 2016).

7.2.1.1. Esfregaço fecal direto

Este método de diagnóstico é utilizado principalmente para a detecção de trofozoítos móveis de *Giardia* nas fezes diarreicas ou no muco das mesmas (CAPC, 2018). Os trofozoítos normalmente não são encontrados nas fezes moldadas e são estruturas que se desintegram e inativam rapidamente (Bowman, 2014). De forma a evitar a sua inativação, o material fecal deve ser fresco; não refrigerado; e as amostras devem ser processadas num período máximo de 30 minutos, com uma pequena quantidade de fezes misturada com uma gota de solução salina, a 37°C. A amostra deve ser colhida da superfície das fezes, onde há maior quantidade de trofozoítos (Koehler et al., 2014; CFSPH, 2012; Zajac & Conboy, 2012). Na ampliação de 100x, os trofozoítos são facilmente reconhecidos pelo seu movimento rápido característico; no entanto, caso fiquem presos no muco, apenas os flagelos poderão ser visíveis (Scorza & Lappin, 2012). Para se visualizarem as suas estruturas internas, deve utilizar-se a ampliação de 400x e pode adicionar-se ao esfregaço, soluto de lugol, azul de metileno ou o verde de metilo, apesar de provocarem a sua inativação. A sensibilidade desta técnica é baixa, variando entre os 30 e os 40% (Scorza & Lappin, 2012). Assim, resultados negativos, não excluem a infeção por *Giardia duodenalis* (Uehlinger et al., 2017). Os oocistos de *Cryptosporidium* não

são detetados de forma fiável através desta técnica, pois são muito pequenos e transparentes, sendo necessário uma coloração adicional para esse efeito (Bowman, 2014; Scorza & Lappin, 2012; Van den Bossche et al., 2015).

7.2.1.2. Esfregaço fecal corado

As técnicas de coloração ajudam na deteção de *Giardia* e *Cryptosporidium* e permitem diferenciá-los de outros microrganismos, protistas e detritos ambientais ou fecais, ao evidenciar a sua morfologia e estrutura interna distinta (Koehler et al., 2014). Estas técnicas podem ser utilizadas em esfregaços fecais diretos ou secos ao ar, em amostras concentradas, fixadas, frescas, refrigeradas ou congeladas (Chalmers & Katzer, 2013; Nichols, 1992).

Os quistos e os trofozoítos de *Giardia* podem ser identificados através de colorações como o Giemsa, o soluto de lugol, a hematoxilina-férrica e o tricrómio (Koehler et al., 2014).

Para o diagnóstico de *Cryptosporidium* existem várias técnicas de coloração como a de Ziehl-Neelsen, Heine, safranina, carbol-fucsina, azul de metileno, Giemsa, Kinyoun e auramina. Em muitos laboratórios, a coloração de Ziehl-Neelsen é a mais utilizada como diagnóstico de rotina (Bowman, 2014; ESCCAP, 2018; Nichols, 1992; Zajac & Lindsay, 2004) devido à sua elevada especificidade para este parasita, na ordem dos 95% (Zaglool, Mohamed, Khodari, & Farooq, 2013). Utilizando esta técnica, os oocistos apresentam-se como estruturas esferóides de cor rosa a vermelho vivo e brilhante, sob um fundo azul-esverdeado de matéria fecal (CAPC, 2017; ESCCAP, 2018; Zajac & Lindsay, 2004). No entanto, o grau de coloração dos oocistos, assim como das suas estruturas internas, é variável e pode haver dificuldade em distingui-los de alguns detritos ou leveduras que também coram de vermelho (apesar de serem amorfas), pelo que requer algum grau de conhecimento e experiência (Chalmers, Campbell, Crouch, Charlett, & Davies, 2011; Smith, 2007). Uma vez que os oocistos detetados são maioritariamente os maduros, esta técnica é capaz de identificar infeções ativas. Tem como vantagens ser uma técnica de rápida e fácil execução e de baixo custo (Omoruyi, Nwodo, Udem, & Okonkwo, 2014). Apesar de ser uma técnica pouco referenciada na deteção de *Giardia* e ter uma baixa sensibilidade, os seus quistos e trofozoítos podem ser detetados com uma cor azul, sendo útil na deteção de coinfeções de *Giardia* spp. com *Cryptosporidium* spp. (Ferreira, 2015; Harrington, 2008).

Estas técnicas de coloração apresentam uma sensibilidade variável; um estudo realizado em ruminantes e equinos reportou uma sensibilidade entre os 54 e os 76% para a coloração de Kinyoun (Mirhashemi et al., 2015); outros estudos reportaram sensibilidades entre os 40 e 90% para a coloração de Ziehl-Neelsen (Chako et al., 2010; Chalmers et al., 2011). Para além disso, como a espécie canina excreta poucos quistos e oocistos, estas técnicas podem ter uma sensibilidade relativamente baixa no diagnóstico da infeção nesta espécie (Scorza & Lappin, 2012).

7.2.1.3. Técnicas de concentração

Apesar de os trofozoítos poderem ser encontrados no esfregaço fecal direto, o diagnóstico de *Giardia* baseia-se maioritariamente na deteção de quistos, que se encontram tanto nas fezes moldadas como nas diarreicas. No entanto, os animais com ausência de sinais clínicos tendem a excretar quistos (Mehlhorn, 2016b; Scorza & Lappin, 2012b; CFSPH, 2012). Estes são mais fáceis de detetar através de técnicas de concentração, por flutuação ou sedimentação, idealmente com centrifugação.

A técnica tradicionalmente utilizada para o diagnóstico de *Giardia* é a flutuação. Esta pode ser realizada com várias soluções saturadas, sendo as mais comuns as de sacarose e de sulfato de zinco. A primeira e outras soluções hiperosmóticas levam à distorção dos quistos, dificultando a sua identificação (Bowman, 2014; ESCCAP, 2018). A solução de sulfato de zinco com uma gravidade específica de 1.18 é a solução de flutuação mais eficiente para recuperar e manter a integridade da morfologia dos quistos de *Giardia*. No entanto, não é a solução recomendada para os exames fecais de rotina uma vez que ovos de parasitas mais pesados, como os de *Taenia* spp. que têm uma gravidade específica de 1.23, podem não ser recuperados (Dryden et al., 2006). A técnica de flutuação com centrifugação demonstrou ser mais eficiente que a flutuação passiva, pois permite recuperar uma maior quantidade de ovos, quistos e oocistos e obter menos resultados falsos-negativos. O método de flutuação passiva deteta apenas 6,5% a 14,7% das amostras positivas a *Giardia* pela flutuação após centrifugação com sulfato de zinco.

Durante muitos anos, a flutuação com sulfato de zinco foi considerada a técnica *gold standard* para o diagnóstico de *Giardia*. No entanto, é um teste de referência imperfeito pois a sua performance é afetada pela natureza intermitente da excreção dos quistos e a sua correta identificação depende muito do nível de treino e experiência do analista (Papini, Carreras, Marangi, Mancianti, & Giangaspero, 2013; Uehlinger et al., 2017). A identificação dos quistos é tecnicamente difícil devido às suas pequenas dimensões e devido a serem facilmente confundíveis com alguns pseudoparasitas e leveduras de tamanho e forma similar, levando a resultados falsos-positivos e fazendo com que este seja um dos parasitas com mais erros de diagnóstico (Dryden et al., 2006; Scorza & Lappin, 2012). A especificidade desta técnica varia entre os 98,4 e os 100% (Uiterwijk et al., 2018). A sensibilidade desta técnica varia entre os 37,5% a 74%, quando se procede apenas a uma análise fecal, pelo que o diagnóstico de *Giardia duodenalis* não deve ser excluído com base numa única análise fecal negativa (Decock, Cadiergues, Larcher, Vermot, & Franc, 2003; Hanson & Cartwright, 2001; Rosoff et al., 1989; Scheffler & Van Etta, 1994). O valor da sensibilidade atinge os 94%, atingindo performances similares aos métodos imunológicos e moleculares, quando são efetuadas pelo menos três flutuações consecutivas, provenientes da colheita de três amostras num período de 3 a 5 dias, e quando analisadas por técnicos com um nível de treino e experiência elevados (Bouزيد et al., 2015; Dryden et al., 2006; Papini & Cardini, 2006). Quando realizada nestas

condições, é o método com uma relação custo-eficiência mais elevada, pois para além do diagnóstico de *Giardia*, permite o diagnóstico de outros parasitas (Uehlinger et al., 2017). Ainda assim, podem haver resultados falsos-negativos pois alguns animais, mesmo sem sinais clínicos, podem não excretar quistos durante várias semanas (Winiecka-Krusnell & Linder, 1995). Rishniw et al. (2010) também questionou a boa performance desta técnica utilizando amostras múltiplas seriadas, através dos maus resultados obtidos no seu estudo. A técnica de sedimentação também é um método adequado para a deteção de quistos de *Giardia* (Koehler et al., 2014). Esta técnica pode ser realizada com formalina-etil acetato ou com formalina-éter, e associada a colorações como o mertiolato-iodo-formaldeído (MIF) (ESCCAP, 2018). A sensibilidade desta técnica na deteção de *Giardia* apresenta valores entre os 31% e os 85,7% e uma especificidade de 100% (Gotfred-Rasmussen, Lund, Enemark, Erlandsen, & Petersen, 2016; Van den Bossche et al., 2015).

Quando as amostras fecais não podem ser processadas de imediato, o seu armazenamento a 4°C durante alguns dias é aceitável. O material fecal a analisar não deve ser congelado. Depois de processadas, as amostras devem ser observadas dentro de 15 a 20 minutos, para evitar a distorção dos quistos; caso contrário devem ser refrigeradas (Scorza & Lappin, 2012). Ao contrário de *Giardia*, as técnicas de flutuação têm uma utilidade extremamente limitada para o diagnóstico de *Cryptosporidium* (Mekaru et al., 2007). É um dos parasitas mais difícil de detetar através desta técnica pois é um dos mais pequenos e os oocistos flutuam num plano superior ao dos outros ovos e quistos e, por isso, a sua identificação requer um elevado grau de conhecimento técnico e experiência (CAPC, 2017; Zajac & Lindsay, 2004). Adicionalmente, e como já referido anteriormente, o facto de os animais de companhia excretarem poucos oocistos, torna esta técnica ainda menos fiável, estando reportados valores de sensibilidade de 21,4% (Mekaru et al., 2007; Scorza & Lappin, 2012).

7.2.2. Métodos imunológicos

7.2.2.1. Imunoensaios de captura de coproantígenos

Os antígenos de *Giardia* e *Cryptosporidium* que são excretados nas fezes, podem ser detetados através de ensaios imunoenzimáticos, nomeadamente ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), ou através de imunocromatografia (IC) (CFSPH, 2012). Estes testes utilizam anticorpos monoclonais direccionados contra proteínas específicas da parede dos quistos e trofozoítos de *Giardia duodenalis* e dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Papini & Cardini, 2006).

A técnica de ELISA permite obter, para além de um resultado qualitativo, um resultado quantitativo através das densidades óticas obtidas, e permite analisar várias amostras em lote. É um método que requer pelo menos uma hora para gerar os resultados, requer material e equipamento dispendioso e pessoal treinado, sendo mais adequada a sua utilização em laboratórios especializados (Papini et al., 2013; Van den Bossche et al., 2015).

Comparativamente à microscopia, tem um custo mais elevado, mas aumenta a eficiência operacional e do diagnóstico, pois permite a análise de várias amostras no mesmo dia e com uma performance superior, quando é realizada uma única amostragem (Soares & Tasca, 2016). Os valores de sensibilidade e especificidade desta técnica para a deteção de *Giardia* apresentados na literatura, são de 51 a 100% e de 87 a 99%, respetivamente (Mekaru et al., 2007; Rimhanen-Finne, Enemark, Kolehmainen, Toropainen, & Hänninen, 2007; Rishniw et al., 2010; Uchôa et al., 2018; Uehlinger et al., 2017). Relativamente a *Cryptosporidium*, os valores apresentados são de 71% para a sensibilidade e de 94 a 97% para a especificidade (Mekaru et al., 2007; Rimhanen-Finne et al., 2007).

Por outro lado, os testes de imunocromatografia estão disponíveis sob a forma de testes de diagnóstico rápido e possibilitam a análise de uma única amostra. Estes não requerem equipamento especializado nem pessoal com treino ou experiência específicos, pois são testes de rápida e fácil preparação e interpretação (Ballweber et al., 2010; Pitães & Carvalho, 2016; Soares & Tasca, 2016). Os valores de sensibilidade e especificidade desta técnica para a deteção de *Giardia* apresentados na literatura, são de 52 a 96% e de 92 a 100%, respetivamente (Dryden et al., 2006; Geurden, Berkvens, Casaert, Vercruysse, & Claerebout, 2008; Mekaru et al., 2007; Papini & Cardini, 2006; Papini et al., 2013; Rishniw et al., 2010; Uchôa et al., 2018; Uehlinger et al., 2017). Já para *Cryptosporidium*, os valores apresentados são de 43 a 71% para a sensibilidade e de 90 a 99% para a especificidade (Mekaru et al., 2007).

Ambas as técnicas permitem utilizar amostras congeladas, ao contrário da microscopia. A maioria dos imunoensaios disponíveis no mercado também permite a utilização de amostras conservadas (Chalmers & Katzer, 2013; Soares & Tasca, 2016).

A maioria dos estudos publicados demonstra que os imunoensaios apresentam uma maior sensibilidade que a microscopia convencional. No entanto, outros autores reportaram sensibilidades semelhantes entre os dois métodos, quando procediam a duas ou três flutuações centrífugas com sulfato de zinco consecutivas (Decock et al., 2003; Uchôa et al., 2018; Uehlinger et al., 2017).

Estes testes podem apresentar resultados falso-positivos devido à excreção antigénica que pode persistir durante semanas a meses após a eliminação do parasita ou devido a reatividade cruzada com outros antigénios fecais. Contrariamente, podem gerar-se resultados falsos-negativos nos casos em que se utiliza a formalina na conservação das amostras, ou quando a concentração antigénica está abaixo dos limites de deteção dos testes, o que se pensa que pode acontecer em animais com infeção crónica subclínica (Koehler et al., 2014; Rishniw et al., 2010). Uma vez que a excreção antigénica é independente e anterior à excreção dos quistos, estes testes permitem a deteção de infeções pré-patentes e de infeções em que os quistos presentes estão em número muito reduzido ou mesmo não intactos, sendo

mais sensíveis que a microscopia também nestes casos (Koehler et al., 2014; Uchôa et al., 2018).

A utilização de testes comerciais desenvolvidos para a medicina humana pode originar resultados falsos-negativos devido às diferenças antigénicas entre os diversos isolados (Mekaru et al., 2007; Papini & Cardini, 2006; Uehlinger et al., 2017). Atualmente, estão disponíveis no mercado testes comerciais validados e aprovados para a deteção de coproantígenos dos dois protozoários em amostras de fezes caninas (ESCCAP, 2018). O mesmo teste pode detetar apenas um ou os dois parasitas ao mesmo tempo, apresentando os testes duplos uma menor sensibilidade e especificidade (Mekaru et al., 2007).

7.2.2.2. Imunofluorescência direta

Esta técnica baseia-se na utilização de anticorpos monoclonais, marcados com isotiocianato de fluoresceína, que reconhecem os epitopos da parede dos quistos de *Giardia* e dos oocistos de *Cryptosporidium* (Koehler et al., 2014). Estes anticorpos emitem fluorescência quando excitados num comprimento de onda específico, tornando visíveis os quistos e oocistos com uma fluorescência verde-maçã. Para tal, é necessário um microscópio de fluorescência com um filtro azul com um comprimento de onda de 450 nm (ESCCAP, 2018; Uehlinger et al., 2017). Como ambos os parasitas estão associados a diarreia do intestino delgado e/ou pode haver uma coinfeção, vários testes comerciais que detetam simultaneamente *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. estão disponíveis no mercado (Scorza & Lappin, 2012).

Apesar do processamento das amostras ser mais moroso do que na microscopia convencional, a análise em si é mais rápida e não requer um nível experiência elevado, uma vez que os quistos e oocistos são facilmente identificados pela sua morfologia e fluorescência. No entanto, a necessidade de equipamento especializado e o elevado custo dos testes comerciais, inviabilizam a sua utilização no diagnóstico clínico de rotina (Scorza & Lappin, 2012; Uehlinger et al., 2017). Relativamente às amostras, quando estas não podem ser imediatamente processadas ou têm de ser expedidas, estas podem ser armazenadas a uma temperatura de 4°C durante alguns dias, não devendo ser congeladas (Scorza & Lappin, 2012).

A maior parte da literatura tem demonstrado que esta técnica tem uma performance superior à microscopia convencional (Gotfred-Rasmussen et al., 2016), nomeadamente à flutuação após centrifugação com sulfato de zinco, e também aos imunoensaios (Geurden et al., 2008; Rishniw et al., 2010; Uehlinger et al., 2017), atingindo uma elevada sensibilidade e especificidade, com valores de 91 a 100% e de 95 a 100%, respetivamente (Chako et al., 2010; Chalmers et al., 2011; Santos, 2016; Uiterwijk et al., 2018). Em relação à sensibilidade deste método na deteção de *Cryptosporidium*, comparativamente às técnicas de coloração, existe alguma controvérsia, uma vez que alguns autores demonstram que é um método mais

sensível, enquanto que outros encontram sensibilidades idênticas para ambas as técnicas (Chalmers et al., 2011; Griffiths, 1998; Manser et al., 2014).

Para além da sua elevada performance, este teste permite obter tanto uma confirmação imunológica, como uma avaliação morfológica, reduzindo assim o risco de falsos-positivos (Scorza & Lappin, 2012). Vários autores e vários laboratórios especializados passaram a adotar esta técnica como *gold standard* e como primeira linha de diagnóstico na deteção de quistos de *Giardia* e de oocistos de *Cryptosporidium* (ESCCAP, 2018; Mirhashemi et al., 2015; Rishniw et al., 2010; CFSPH, 2012).

Relativamente a *Cryptosporidium*, a intensidade da fluorescência dos oocistos pode variar devido à variação antigénica entre os vários isolados da mesma espécie ou quando há infeções mistas na mesma amostra (Scorza & Lappin, 2012).

7.2.3. Métodos moleculares

7.2.3.1. Polymerase Chain Reaction

Vários protocolos de PCR foram descritos para a amplificação do ADN de *Giardia* e *Cryptosporidium* nas fezes de várias espécies de hospedeiros. Estes protocolos têm como objetivo amplificar fragmentos específicos de determinados genes que vão permitir a identificação a nível da espécie, do genótipo/*assemblage* e do subtipo do isolado presente na amostra (Koehler et al., 2014; Mirhashemi et al., 2015). Os marcadores genéticos mais utilizados para a identificação de *Giardia* são os genes que codificam a proteína β -giardina (β -g); as enzimas triose-fosfato isomerase (*tpi*) e glutamato desidrogenase (*gdh*); o fator de alongamento 1 α (*ef1 α*); as VSP; a proteína GLORF-C4 (do inglês, *G. lamblia Open Reading Frame-C4*) e os genes das subunidades do ácido ribonucleico ribossomal (rRNA) como o 18S rRNA e o *small subunit* (SSU) rRNA (Koehler et al., 2014; Ryan & Cacciò, 2008). Relativamente a *Cryptosporidium*, os marcadores genéticos mais utilizados atualmente são o gene 18S rRNA e o gene que codifica a glicoproteína de 60-kDa (gp60) (Zahedi et al., 2016). A atribuição de determinado *assemblage* aos isolados analisados nem sempre é consistente, uma vez que os diferentes marcadores genéticos podem dar resultados diferentes, devido à variação genética entre os isolados. De forma a tornar a identificação dos *assemblages* mais fiável, é recomendada a realização da genotipagem com múltiplos marcadores (Chalmers & Katzer, 2013; Ryan & Cacciò, 2008; Uchôa et al., 2018).

Vários autores consideram que este é um método com uma sensibilidade e especificidade superior ou similar aos métodos de microscopia convencional e de imunodiagnóstico, apresentando valores de sensibilidade de 90 a 100% e de especificidade de 92 a 100% (Gotfred-Rasmussen et al., 2016; Papini et al., 2013; Scorza & Lappin, 2012; Soares & Tasca, 2016; Traub et al., 2009). Já outros autores, revelaram uma performance fraca para este método, relativamente à sensibilidade e/ou especificidade, com valores de 29 a 66% para a

sensibilidade e de 56 a 58% para a especificidade (Mirhashemi et al., 2015; Traub et al., 2009; Uchôa et al., 2018; Uehlinger et al., 2017).

Esta é uma técnica com uma performance variável devido a vários fatores que podem levar à falha na extração do ADN e a resultados falsos-negativos (Scorza & Lappin, 2012; Uehlinger et al., 2017). Entre os vários fatores temos: baixa densidade parasitária ou de ADN; distribuição heterogênea das formas parasitárias na amostra; quantidade reduzida de amostra; presença de inibidores de PCR nas fezes (como a hemoglobina, bilirrubina, sais biliares ou carboidratos complexos); presença de contaminantes, como matéria orgânica, muito comum nas fezes dos animais (Chalmers & Katzer, 2013; Mirhashemi et al., 2015; Uchôa et al., 2018; Uehlinger et al., 2017). Podem também ser gerados resultados falsos-positivos, uma vez que o ADN de *G. duodenalis* pode ser detetado nas fezes após a eliminação do parasita, dependendo do tratamento (Gottfred-Rasmussen et al., 2016). Adicionalmente, um resultado positivo não significa que tanto *Giardia* como *Cryptosporidium* sejam a causa dos sinais clínicos, uma vez que as infeções subclínicas são frequentes. Assim, e com base na sua performance, não é recomendada a sua utilização como único método de diagnóstico. A análise de PCR requer também a utilização de equipamento sofisticado, um nível de treino elevado, implica um tempo de execução longo e é dispendiosa, tornando-a impraticável no contexto clínico. A sua principal utilidade, é portanto, permitir a genotipagem para a avaliação do risco de transmissão zoonótica em estudos epidemiológicos (Scorza & Lappin, 2012; Uehlinger et al., 2017). No entanto, a identificação das espécies e *assemblages*, a nível clínico, pode ser realizado quando o risco de transmissão zoonótica representa uma preocupação para os tutores (ESCCAP, 2018; Scorza & Lappin, 2012b).

As amostras a utilizar devem ser frescas ou congeladas e não devem ser fixadas (Chalmers & Katzer, 2013).

Existe uma constante controvérsia acerca do melhor método de diagnóstico mas a maioria dos autores suporta a ideia de uma combinação de várias técnicas em amostras múltiplas seriadas (Soares & Tasca, 2016; CFSPH, 2012; Uchôa et al., 2018). A CAPC recomenda testar os animais que apresentam sinais clínicos com um esfregaço fecal e uma flutuação com centrifugação e caso estes não permitam o diagnóstico, deve ser realizado um imunoensaio complementar.

O diagnóstico laboratorial é apenas recomendado para animais com sinais clínicos, quando há um risco específico de transmissão zoonótica ou em ambientes de elevada densidade animal para controlo e prevenção da doença. O rastreio de animais saudáveis não é recomendado pois muitos são portadores com infeção subclínica que podem manter-se positivos nos testes de diagnóstico por um longo período de tempo e podem também ser positivos para *Giardia* num episódio de diarreia de outra origem (Claerebout, 2018; CFSPH, 2012). Não existe evidência de uma associação entre a contagem de quistos e a ocorrência

ou gravidade dos sinais clínicos (ESCCAP, 2018). Para além disso, é considerado que os cães com infeção subclínica não representam um risco significativo para a saúde dos humanos, sendo a rara a infeção de humanos com os *assemblages* específicos caninos (ESCCAP, 2018; CFSPH, 2012).

8. Controlo

8.1. Controlo da giardiose

8.1.1. Tratamento médico

A eliminação da infeção por *Giardia* é difícil de atingir e a maioria dos protocolos terapêuticos descritos não resultou na eliminação completa do parasita após o tratamento, sendo o seu principal objetivo a interrupção dos sinais clínicos (ESCCAP, 2018; Saleh, Gilley, Byrnes, & Zajac, 2016). As opções terapêuticas normalmente utilizadas incluem:

- a) Metronidazol, que apesar de não ser aprovado por muitas agências reguladoras, como a *Food and Drug Administration* (FDA), está licenciado na maioria dos países europeus para uso médico-veterinário em cães e gatos e é um dos fármacos mais utilizados para o tratamento de *Giardia* (ESCCAP, 2018; Moron-Soto, Gutierrez, Sumano, Tapia, & Alcala-Canto, 2017). Tem como efeitos adversos o vômito, anorexia, neurotoxicidade, hepatotoxicidade, disbiose, neutropenia e hematúria (Ortega-Pierres, Jex, Ansell, & Svärd, 2017; Ramsey, 2017; Thompson & Ash, 2016). Para além disso tem potencial mutagénico e carcinogénico (Moron-Soto et al., 2017) e elimina a infeção em apenas 50 a 66% dos casos (CAPC, 2018; Raza et al., 2018). Existe um maior risco de efeitos adversos aquando do seu uso prolongado ou em doses mais elevadas, não sendo recomendada esta prática em casos crónicos ou refratários (Moorhead, 2017). A dose recomendada é de 25 mg/kg, duas vezes por dia, ou de 50 mg/kg, uma vez por dia, por via oral, durante cinco a sete dias (CAPC, 2018; ESCCAP, 2018);
- b) Fenbendazol, que é reportado como tendo boa eficácia e por interromper a excreção dos quistos ao fim de três dias consecutivos de tratamento (Raza et al., 2018), podendo, no entanto, resultar em falha terapêutica em até 50% dos casos (Papich, 2016). A dose recomendada é de 50 mg/kg, uma vez por dia, durante três a cinco dias, podendo o tratamento ser repetido após duas semanas, se houver recorrência dos sinais clínicos (CAPC, 2018; ESCCAP, 2018). Este fármaco tem uma boa margem de segurança e uma boa tolerância, mesmo numa dose 6 vezes a recomendada e numa duração 3 vezes a recomendada, sendo também seguro em animais gestantes (Peterson & Talcott, 2013; Ramsey, 2017). Alguns estudos demonstram uma maior eficácia do fenbendazol comparativamente ao metronidazol, enquanto outros demonstram o contrário (Nicolas & Rigaut, 2018; Saleh et al., 2016);
- c) Combinação de febantel, pirantel e praziquantel, que também é eficaz no tratamento de *Giardia* em cães quando administrada uma vez por dia durante três dias consecutivos,

na dosagem *standard* de desparasitação (15,0 mg/kg de febantel, 14,4 mg/kg de pirantel, 5,0 mg/kg de praziquantel) (CAPC, 2018; ESCCAP, 2018). Contudo, a sua eficácia na interrupção da excreção de quistos é de curto-prazo (Bowman et al., 2009; Saleh et al., 2016).

A escolha do fármaco pode variar consoante o quadro clínico do animal. Anti-helmínticos como o fenbendazol podem ser utilizados em situações de coinfeções com nemátodes ou céstodes. Nos casos em que existe um sobrecrecimento bacteriano ou uma componente inflamatória, a utilização de metronidazol tem um benefício acrescentado (Nicolas & Rigaut, 2018).

Existem outros fármacos com atividade giardicida. O albendazol foi eficaz num estudo com cães mas a sua utilização está associada a vômito, hematoquézia, mielossupressão, aborto e teratogenicidade, não sendo considerado um fármaco seguro nem recomendado (CAPC, 2018; Moron-Soto et al., 2017). A utilização de oxfendazol e de derivados do metronidazol como o ronidazol, o ipronidazol e o tinidazol, revelou ser eficaz mas num pequeno número de animais (Bowman, 2014; Połozowski, Jelonek, Cekiera, & Piekarska, 2016; Scorza & Lappin, 2012; Villeneuve, Beugnet, & Bourdoiseau, 2000), tendo este último efeitos adversos similares ao metronidazol (Papich, 2016). A quinacrina era o fármaco historicamente utilizado quando o metronidazol era ineficaz. No entanto, é um fármaco mal tolerado pois frequentemente causa letargia, anorexia e vômito (Tams, 2003) e mais estudos sobre a sua eficácia são necessários (Scorza & Lappin, 2012).

Para além dos efeitos adversos, frequentemente é reportada a ineficácia dos fármacos tradicionalmente utilizados no tratamento de *Giardia* em cães (Ural, Gultekin, Pasa, Aysul, & Ayan, 2017). Nos humanos já foi documentada resistência aos nitroimidazóis, onde se inclui o metronidazol, e aos benzimidazóis, onde se inclui o albendazol, sendo causa de tratamento refratário em até 20% dos casos (Ortega-Pierres et al., 2017). Nos animais ainda não foram reportadas resistências aos fármacos utilizados no tratamento de *Giardia*. No entanto, vários casos de infeções persistentes e tratamentos refratários em cães já foram reportados (Bowman, 2014; Claerebout, 2018). Assim outras opções terapêuticas têm sido estudadas.

A cloroquina revelou ser uma opção terapêutica económica e de elevada eficácia, com uma redução na excreção dos quistos de 99,9%, na dose de 2,5 mg/kg, por via oral, duas vezes por dia, durante 5 dias consecutivos (Ural et al., 2017).

Foi reportada eficácia na utilização de nitazoxanida na dose de 75 mg/kg ou 150 mg/kg a cada 14 dias, no tratamento de *Giardia* e na redução da excreção dos quistos. Este fármaco demonstrou uma eficácia similar ao metronidazol, mas menos efeitos adversos, podendo haver vômito numa pequena percentagem de casos na dose mais elevada. A sua atividade giardicida foi também similar à combinação de fármacos que contém febantel, pirantel e praziquantel, mas resultou numa maior redução da excreção dos quistos quando comparado a este. A administração de uma dose única facilita o tratamento dos animais nos canis e

abrigos, e a sua eficácia contra outros parasitas frequentemente presentes em coinfeções nos cães de canil, sugerem que este seja um fármaco de largo espectro adequado neste contexto (Moron-Soto et al., 2017).

A utilização de azitromicina em dois casos de tratamentos refratários com metronidazol e fenbendazol, revelou ser eficaz na resolução da diarreia e na redução da excreção dos quistos. A dose administrada foi de 10 mg/kg, uma vez por dia, durante 5 dias e nenhum efeito adverso foi observado (Datz & Harter, 2014; Zygmier, Jaros, Gójska-Zygmier, & Wedrychowicz, 2008). A paromomicina é outro fármaco potencial, que já mostrou ter alguma eficácia no tratamento de *Giardia*; no entanto existe pouca informação relativamente à sua utilização (Moron-Soto et al., 2017; Scorza & Lappin, 2012).

Apesar de não existirem estudos suficientes que sustentem o benefício de terapêuticas adjuvantes como a suplementação com fibra, silimarina e probióticos no tratamento de *Giardia* em cães, estudos em outras espécies levam a crer que sim. É sugerido que a adição de fibra insolúvel ajuda a controlar os sinais clínicos e a persistência da infeção ao inibir o sobrecrecimento bacteriano e a adesão dos trofozoítos (Lappin, 2011). A adição de silimarina pareceu ajudar a compensar a perda de peso e aumentou os níveis de proteína total e albumina em comparação aos cães tratados apenas com metronidazol. Num estudo com roedores, a administração de probióticos diminuiu a excreção de quistos. No entanto, este e outros efeitos positivos ainda não foram reconhecidos em cães adultos com giardiose crónica (Scorza & Lappin, 2012)

O tratamento de animais sem sinais clínicos é uma questão controversa. Uma vez que estes animais não são considerados pela *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) um risco significativo para a saúde dos humanos, a eliminação da infeção nestes animais passa a ser secundária (CAPC, 2018; Lappin, 2011; Scorza, 2013). Para além disso, a infeção pode persistir apesar do tratamento ou pode ocorrer rapidamente a reinfeção. O tratamento destes animais pode também potenciar o desenvolvimento de isolados resistentes e alguns fármacos podem causar efeitos adversos. Por estas razões, a maioria dos autores não recomenda o tratamento de animais que não apresentem sinais clínicos. Este é, no entanto, recomendado em ambientes de elevado risco como nos canis e criadores com uma elevada incidência de diarreia nos cachorros, ou nos casos de tutores imunocomprometidos ou com crianças pequenas. Estes animais e outros coabitantes não devem ser sujeitos a mais do que um curso terapêutico (CAPC, 2018; ESCCAP, 2018; CFSPH, 2012).

Uma reavaliação deve ser realizada aproximadamente cinco dias após a conclusão do tratamento. É recomendado efetuar uma flutuação com centrifugação para a deteção dos quistos e não um teste de deteção de coproantígenos. Uma vez que este se pode manter positivo por períodos variáveis de tempo após o tratamento, não permite identificar uma reinfeção nem avaliar o sucesso terapêutico (CAPC, 2018; ESCCAP, 2018).

Quando um tratamento é refratário, pode ser realizado outro curso terapêutico com, por exemplo, a combinação de fenbendazol (50 mg/kg, uma vez por dia) e metronidazol (25 mg/kg, duas vezes por dia), durante cinco a dez dias, pois pode resultar numa melhor resolução dos sinais clínicos e da excreção dos quistos (CAPC, 2018). Embora alguns clínicos só recorram a uma terapia combinada de dois grupos farmacológicos diferentes quando a monoterapia falha, outros também a recomendam como opção de tratamento inicial. Outra medida recomendada é a manutenção de uma monoterapia mas com um grupo farmacológico diferente (Lappin, 2011).

Entre as várias causas de tratamento refratário podemos ter: i) a eliminação incompleta do parasita devido aos fármacos utilizados não serem 100% eficazes (Claerebout, 2018), a um nível inadequado de fármaco, potenciais resistências aos fármacos ou devido ao sequestro de *Giardia* nos ductos pancreáticos ou da vesícula biliar (CAPC, 2018; Ortega-Pierres et al., 2017); ii) imunossupressão; iii) coinfeções com outros parasitas, incluindo *Cryptosporidium*; iv) sobrecrecimento bacteriano e; v) existência de doenças subjacentes como a doença inflamatória intestinal e insuficiência pancreática exócrina (ESCCAP, 2018; Lappin, 2011; Scorza, 2013). Outra causa para um tratamento refratário e pouco duradouro, mesmo quando a eficácia dos fármacos é elevada, é a reinfeção que ocorre frequentemente nos animais tratados, principalmente nas áreas endémicas como os cães e abrigos (Beelitz, Leonhard & Pfister, 2006).

A reinfeção ocorre devido a fatores como um período pré-patente muito curto, resistência a desinfetantes, resistência às condições ambientais, medidas de higiene inadequadas, *stress* e presença de quistos no pelo (Moron-Soto et al., 2017). Assim, um controlo eficaz da giardiose requer a associação entre o tratamento médico e medidas higiénicas de prevenção (ESCCAP, 2018). De facto, vários estudos já demonstraram que quando não são adotadas medidas sanitárias e de prevenção, os cães voltam a excretar quistos após um curto período de tempo depois do tratamento antiparasitário (Moron-Soto et al., 2017; Villeneuve et al., 2000). Beelitz et al. (2006) também demonstrou que diferentes condições de alojamento têm um impacto diferente na reinfeção e na excreção após o tratamento. Pelo menos 35,3% das amostras dos cães mantidos em grupos ou canis, apresentaram excreção ao 7º, 14º e 28º dia após o tratamento. Já nos cães mantidos individualmente, apenas 15,4% dos cães excretaram quistos de *Giardia* e apenas no 7º dia após o tratamento.

8.1.2. Medidas higiénicas e prevenção

Considera-se que a prevenção é difícil na maioria das espécies uma vez que este parasita é muito prevalente no meio ambiente (CFSPH, 2012). No entanto, existem várias medidas higiénicas que reduzem a contaminação ambiental, a pressão da reinfeção e a transmissão animal-animal (ESCCAP, 2018).

A manutenção de um ambiente, incluindo tanto o pavimento como qualquer fómite, limpo, desinfetado e seco, é a principal estratégia que permite reduzir a carga parasitária. O ambiente deve secar por completo, após a limpeza, para promover a dissecação dos quistos (Raza et al., 2018; CFSPH, 2012).

No caso dos canis, a limpeza das *boxes* deve incluir, idealmente, a remoção rápida das fezes e a limpeza mecânica do pavimento de forma regular. Há indicação de que os quistos são destruídos com água quente (>65°C) a elevada pressão e com a desinfecção com compostos de amónio quaternário. A lixívia não é adequada, pois os quistos de *Giardia* não são sensíveis ao cloro. A utilização de pavimentos em cimento é preferível aos pavimentos em terra pois facilita a limpeza e reduz a sobrevivência dos parasitas e, consequentemente, a contaminação ambiental (Claerebout, 2018; ESCCAP, 2018; Raza et al., 2018). Após a limpeza, as superfícies devem ser limpas a vapor ou desinfetadas e deixadas secar completamente (Bowman, 2014; CFSPH, 2012). Durante estes procedimentos, os animais devem sair das instalações ou ser transferidos para uma zona limpa, que deve existir em todos os canis (Scorza & Lappin, 2012).

A limpeza e desinfecção de quaisquer potenciais fómites como os recipientes para a comida e água, camas, luvas, açaimes, armadilhas e o vestuário e calçado dos trabalhadores dos canis/abrigos, são recomendadas para o controlo da disseminação do parasita (Raza et al., 2018). Os recipientes para a comida e água devem ser limpos diariamente com água fervente. As medidas de higiene pessoais dos trabalhadores são também fundamentais (ESCCAP, 2018). As fezes devem ser eliminadas em conjunto com os resíduos urbanos municipais (CAPC, 2018). O controlo de roedores e a redução do contacto com aves pode diminuir o risco de infeção (CFSPH, 2012).

É recomendado realizar a lavagem dos cães infetados com champô à base de digluconato de clorohexidina, no início e no fim do tratamento médico para remover os detritos fecais e os quistos aderentes ao pelo e assim reduzir a possibilidade de reinfeção (ESCCAP, 2018; Moron-Soto et al., 2017). Pode ser vantajoso secar o pelo na região perianal (CFSPH, 2012). De forma a evitar a introdução ou reintrodução da infeção, aquando da introdução de novos animais numa casa com outros animais livres de infeção ou num canil, devem ser realizados testes para a deteção de coproantígenos. No caso dos animais com diarreia ou portadores com infeção subclínica, devem ser sujeitos a quarentena e a um diagnóstico apropriado (ESCCAP, 2018).

8.1.3. Vacinação

Apesar da imunização já ter sido utilizada no passado, esta demonstrou não ser totalmente eficaz, foi considerada como “geralmente não recomendada” nos *guidelines* de vacinação e acabou por ser descontinuada (CFSPH, 2012).

8.2. Controlo da criptosporidiose

8.2.1. Tratamento médico

Uma vez que a maioria dos casos de criptosporidiose tem resolução espontânea, apenas terapia de suporte é habitualmente necessária, incluindo a reposição de fluidos e medicação espasmolítica (ESCCAP, 2018; Scorza & Tangtrongsup, 2010). Não existe nenhum tratamento registado para a criptosporidiose em cães e gatos e existem poucos estudos publicados sobre esta matéria. Mais de 100 compostos foram testados em humanos, ratos e bovinos e nenhum deles eliminou a infeção por *Cryptosporidium* ou controlou os sinais clínicos de forma consistente. Assim, o objetivo principal da terapêutica é a resolução da diarreia (ESCCAP, 2018; Scorza & Tangtrongsup, 2010). No entanto, os seguintes fármacos e dosagens utilizadas em animais com diarreia persistente e excreção de oocistos, apesar de não se basearem em estudos controlados, demonstraram alguma eficácia (CAPC, 2017; Zajac & Lindsay, 2004):

- a) A paromomicina, um aminoglicosídeo, foi utilizado num número limitado de animais, levando à redução da excreção de oocistos para níveis indetetáveis, mas desconhece-se se o parasita foi eliminado. A dose recomendada é de 125 a 165 mg/Kg, uma ou duas vezes por dia, durante pelo menos 5 dias (Papich, 2016; Scorza & Lappin, 2012). Se o animal responder à terapia na primeira semana e não existirem sinais de toxicidade, o tratamento deve ser prolongado por mais uma semana após a resolução da diarreia. Este fármaco não deve ser administrado a animais com diarreia sanguinolenta pois pode ser absorvido sistemicamente e provocar nefrotoxicidade e ototoxicidade (Scorza & Tangtrongsup, 2010).
- b) A azitromicina, um macrólido, foi utilizada com sucesso no tratamento de bovinos mas apresentou uma eficácia variável em humanos, ratos e gatos (Shahiduzzaman & Dauschies, 2012). A dose recomendada para cães é de 5 a 10 mg/kg, uma vez por dia, durante 5 a 7 dias, aumentando depois o intervalo da administração para 48 horas (Papich, 2016; Ramsey, 2017). Não existe informação suficiente sobre a utilização, a farmacocinética e a eficácia deste fármaco na espécie canina, mas parece ser um fármaco de uso seguro, tendo como potencial efeito adverso uma ligeira alteração gastrointestinal. A duração ótima do tratamento é desconhecida, mas pensa-se que sejam necessárias várias semanas para que a diarreia seja totalmente resolvida (Ramsey, 2017; Scorza & Tangtrongsup, 2010; Shahiduzzaman & Dauschies, 2012).
- c) A nitazoxanida, um fármaco eficaz contra um largo espectro de parasitas e bactérias, é o único fármaco aprovado pela FDA para o tratamento de criptosporidiose humana (Moron-Soto et al., 2017). Existe muito pouca informação sobre a sua utilização em cães (Papich, 2016), sendo reportada a dose de 25 mg/kg, duas vezes por dia, durante pelo menos 5 dias (Scorza & Tangtrongsup, 2010). Mais recentemente foi publicado um estudo controlado que avaliou a sua eficácia em cães. Este estudo sugere que a

administração de nitazoxanida numa dose única de 75 mg/kg, a cada 14 dias, é eficaz no tratamento de criptosporidiose e giardiose canina (Moron-Soto et al., 2017). Pode haver vômito como efeito secundário e só é eficaz na presença de uma resposta imunitária adequada (Shahiduzzaman & Dauschies, 2012).

Desconhece-se se a utilização de terapêuticas adjuvantes como probióticos e dietas ricas em fibra trazem benefícios para o tratamento de criptosporidiose (Scorza & Tangtrongsup, 2010). Relativamente à vacinação, tem sido feita investigação ao longo dos anos, mas ainda não foi desenvolvida nenhuma vacina eficaz contra *Cryptosporidium* (Khan, Shaik, & Grigg, 2018). Uma vez que a duração ótima da terapêutica é desconhecida e a maioria dos protocolos não elimina a infeção por *Cryptosporidium* de forma consistente, os sinais clínicos em alguns animais podem persistir mesmo no fim do período estipulado do protocolo terapêutico. Nestes casos, pode estar indicado o prolongamento do tratamento, desde que haja melhorias desde o início do mesmo. Também por estas razões, parece haver pouca indicação para a repetição dos testes de diagnóstico após a resolução da diarreia (Scorza & Lappin, 2012; Scorza & Tangtrongsup, 2010).

8.2.2. Medidas higiénicas e prevenção

Os oocistos de *Cryptosporidium* são resistentes a temperaturas elevadas e à maioria dos desinfetantes, como o hipoclorito de sódio, nas concentrações e tempos de exposição normalmente recomendados. No entanto, alguns agentes são eficazes se utilizados em concentrações elevadas ou com tempos de exposição mais longos. Desinfetantes à base de cresóis, formaldeído e soluções de amónia concentrada a 50% aplicada durante trinta minutos, foram eficazes na inativação dos oocistos. Peróxido de hidrogénio a 10% durante pelo menos duas horas ou hipoclorito de sódio numa concentração de 3 a 6% durante doze horas, destruíram 99% dos oocistos. Já tempos de exposição curtos a concentrações relativamente baixas deste último podem resultar num paradoxal aumento da infecciosidade. A ebulição durante um minuto, temperaturas acima dos 65°C, calor húmido (vaporização, pasteurização ou autoclavagem), ciclos de congelação-descongelação ou dissecação são alguns dos métodos de desinfeção mais práticos (Scorza & Tangtrongsup, 2010; CFSPH, 2018).

Deve ser evitado o contacto com alimentos e água contaminada ou com hospedeiros paraténicos. O alojamento dos animais em instalações *indoor* e a dieta comercial pode também diminuir a possibilidade de exposição ao parasita. Todas as medidas higiénicas e sanitárias descritas para *Giardia* se aplicam a *Cryptosporidium*. Contudo, é difícil mitigar a dispersão deste protozoário dentro de um grupo de animais (Scorza & Lappin, 2012; Scorza & Tangtrongsup, 2010).

9. Considerações de saúde pública

Como já foi discutido no tópico 5.3., pessoas imunocompetentes raramente são infetadas pelos *assemblages* e espécies específicos(as) caninos(as) e o facto de tanto os humanos como os cães da mesma casa estarem infetados, não implica transmissão zoonótica. No entanto, nos casos em que os tutores de cães infetados por *Giardia* desenvolvem sinais clínicos, devem ser aconselhados a consultar o seu médico. Quando uma pessoa tem criptosporidiose, é recomendável que não frequente o local de trabalho, escolas ou outros ambientes públicos até 48 horas após o último episódio de diarreia. Qualquer pessoa deve lavar as mãos depois de utilizar a casa-de-banho e antes de alimentar ou manusear animais (CAPC, 2018; Scorza & Lappin, 2012). Pessoas imunocomprometidas devem limitar a sua exposição a animais infetados ou doentes, e tutores de animais jovens devem ser aconselhados a adotar protocolos de higiene adequados (ESCCAP, 2018).

Capítulo III: Estudo - Comparação da prevalência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. entre canídeos de clínica e de canil da região de Lisboa, Portugal.

1. Objetivos

O presente estudo teve como principais objetivos:

- a) determinar a prevalência dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., numa amostra da população canina da região de Lisboa;
- b) comparar os vários métodos de diagnóstico e as suas vantagens do ponto de vista do utilizador;
- c) comparar a prevalência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. entre cães de clínica e de canil (CRO), relacionando-a com os diversos fatores de risco (origem, idade, sexo e raça) e consistência fecal;
- d) comparar a prevalência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. entre os cães de dois canis diferentes, relacionando-a com os planos de desparasitação e higienização praticados e densidade populacional;
- e) avaliar a população parasitária presente na população canina estudada;
- f) determinar a prevalência de coinfeções por *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. e com outros parasitas gastrointestinais;
- g) avaliar o risco zoonótico que estes cães representam para as pessoas que lidam com estas populações caninas em estudo.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostragem e locais de recolha

Durante o período de maio a julho de 2016 foram recolhidas 60 amostras fecais de cães, provenientes de uma clínica veterinária e de dois centros de recolha oficial (CRO) de animais, pertencentes respetivamente ao concelho de Oeiras, Cascais e Lisboa, de forma a abranger várias zonas da região de Lisboa.

2.2. Caracterização dos centros de recolha oficial de animais

2.2.1. Casa dos Animais de Lisboa

Este CRO que se localiza no Parque Florestal de Monsanto realiza a captura e tratamento dos animais errantes da cidade de Lisboa, executa ações com vista à redução do seu abandono e promove a adoção responsável. Concomitantemente, executa tarefas inerentes à profilaxia da raiva e outras doenças zoonóticas.

Tem capacidade para 160 a 170 cães e 50 gatos, albergando no momento da colheita o número máximo de animais. Estes são alojados em parques (Figura 14), em *boxes* individuais ou em *boxes* partilhadas com 2 a 6 cães (Figura 15, A). O agrupamento dos animais é feito de acordo com a espécie, sexo, idade, estado de saúde, motivo de entrada e comportamento.

O alojamento dos cães e gatos é realizado em áreas distintas e inclui áreas de quarentena, isolamento, sequestro antirrábico, enfermaria, zona de fêmeas com ninhadas e zonas de adoção. O pavimento das várias áreas é constituído por cimento nos parques (Figura 14) e por um material antiderrapante, de fácil lavagem e higienização, nas *boxes* (Figura 15, B).

Figura 14 – Alojamento dos animais em parques, no CRO de Lisboa. Fonte original.



Figura 15 – A) Alojamento dos animais em *boxes* partilhadas, no CRO de Lisboa; B) Pavimento das *boxes*, no CRO de Lisboa. Fonte original.



Aquando da entrada dos animais, estes são submetidos a um exame de estado geral, à vacinação, desparasitação e ficam de quarentena durante 15 dias, altura durante a qual também são esterilizados. Caso se detete alguma doença, procede-se ao tratamento e o animal permanece no isolamento até à sua cura. O tipo de alimento que os animais ingerem é ração seca e húmida. Relativamente à profilaxia parasitária, tanto é realizada a

desparasitação externa como a interna, sendo a externa realizada com fluralaner ou a associação de imidaclopride com permetrina e a interna é realizada com a associação de febantel, pirantel e praziquantel. A desparasitação interna é realizada no momento da entrada, 15 dias depois, de seguida com uma frequência de 3 em 3 meses e por fim no momento da adoção. Não se realizam exames coprológicos de rotina; apenas quando aparecem surtos de diarreia.

A higienização dos pavimentos e paredes é uma tarefa diária e compreende a limpeza e remoção dos detritos físicos com água e a desinfecção com um produto composto por cloro (trocloseno de sódio).

2.2.2. Centro de Recolha Oficial de Animais de Cascais

Este CRO está a funcionar na Associação São Francisco de Assis, no Zambuieiro, tendo capacidade para 45 cães e 45 gatos, instalações clínicas com sala de cirurgia, sala de vacinação antirrábica e de colocação de microchip, espaço de recobro para cães e gatos e também para acolhimento temporário de animais de grande porte. No momento da colheita, o CRO albergava o número máximo de animais.

Tem como áreas de atuação a sanidade e bem-estar animal, assegurando a profilaxia da raiva e outras doenças transmissíveis. Em colaboração com a Associação São Francisco de Assis - Cascais, procedem à recolha de animais errantes, tratamento e promoção da adoção. Realizam ações de controlo do bem-estar animal nos locais de residência e em situações de insalubridade. Não se realizam eutanásias de animais e é o local obrigatório para a quarentena oficial de animais agressores que não possuam a vacinação antirrábica válida.

As instalações dispõem de 32 *boxes* para cães e 10 para gatos e ainda duas áreas no exterior com cerca de 16m² cada para felinos, feitas de madeira e com cobertura de rede. Algumas das *boxes* para cães tinham capacidade para mais de um animal, consoante a sua morfologia e o pavimento é constituído por cimento. O critério de agrupamento tem em conta a idade, temperamento e estado clínico.

No momento da entrada, os animais são sujeitos a um exame de estado geral, são registados, identificados eletronicamente e fotografados. É realizada a desparasitação interna e externa, são vacinados com a vacina polivalente (vírus da esgana, adenovírus canino, vírus parainfluenza canino, parvovírus canino e *Leptospira* spp.), segundo o protocolo aconselhado pela ASPCA (do inglês, *American Society for the Prevention of Cruelty to Animals*), a não ser que critérios clínicos o desaconselhem, e são sujeitos a uma quarentena de 15 dias. Caso o animal apresente alguma condição clínica, é instituído o tratamento adequado bem como cuidados higiénicos ou de enriquecimento ambiental específicos. Relativamente ao manuseio dos animais, este inclui registo diário pelos tratadores de ocorrências verificadas antes do início das limpezas, como alterações nas fezes e urina, vómitos e outros, e comunicação ao médico veterinário; limpeza e desinfecção duas vezes por dia com produtos à base de cloro;

observação diária dos animais nas *boxes* pelo médico veterinário; exercício dos animais durante pelo menos 20 minutos por dia, com o seu registo em ficha adequada; alimentação com ração húmida e seca; e avaliação clínica dos animais uma vez por mês.

A desparasitação externa e interna é realizada com desparasitantes de largo espectro (como os do CRO anterior), sendo esta última realizada, para além do momento da entrada, de 6 em 6 meses e quando necessário. Apenas se realizavam exames coprológicos no caso de diarreias persistentes ou no caso de aparecimento de surtos de diarreia. Nestes casos, o médico veterinário faz uma avaliação clínica geral e institui cuidados especiais de limpeza e desinfeção a toda a ala do alojamento.

2.3. Colheita, acondicionamento e transporte das amostras

As amostras dos cães de clínica foram colhidas diretamente do solo pelos tutores dos mesmos e a recolha das amostras dos cães de canil foi realizada pelos tratadores, diretamente do pavimento das *boxes*. Todas as amostras foram acondicionadas individualmente em sacos de plástico, identificadas e transportadas, logo de seguida, numa caixa isotérmica refrigerada para o Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-UL, tendo sido conservadas no frigorífico à temperatura de 4°C. O processamento das amostras para a técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco e para a coloração de Ziehl-Neelsen foi sempre realizado no próprio dia da colheita, exceto 8 das amostras que, por questões logísticas, foram processadas 3 dias depois. Já para a técnica de imunofluorescência direta, o processamento de algumas amostras demorou cerca de uma semana.

A colheita das amostras foi feita através de uma amostragem de conveniência e cada amostra foi proveniente de um só animal. As amostras foram identificadas quanto à origem do animal, sexo, idade, raça, peso e consistência fecal (Tabela 2).

Tabela 2 – Escala de classificação da consistência fecal.

Consistência fecal	Características
Moldada	Fezes com forma e húmidas
Pastosa	Fezes sem forma e muito húmidas
Líquida	Fezes aquosas

2.4. Métodos de diagnóstico

No Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-UL, antes das análises parasitológicas propriamente ditas, as amostras foram avaliadas macroscopicamente quanto à sua consistência (Tabela 2), quanto à presença de parasitas macroscópicos e foram homogeneizadas de forma a que os quistos de *Giardia* spp. e os oocistos de *Cryptosporidium* spp. se distribuíssem uniformemente por toda a amostra.

Todas as amostras foram submetidas a três métodos de diagnóstico: flutuação após centrifugação com sulfato de zinco, imunofluorescência direta e esfregaço fecal com coloração de Ziehl-Neelsen.

2.4.1. Flutuação após centrifugação com sulfato de zinco

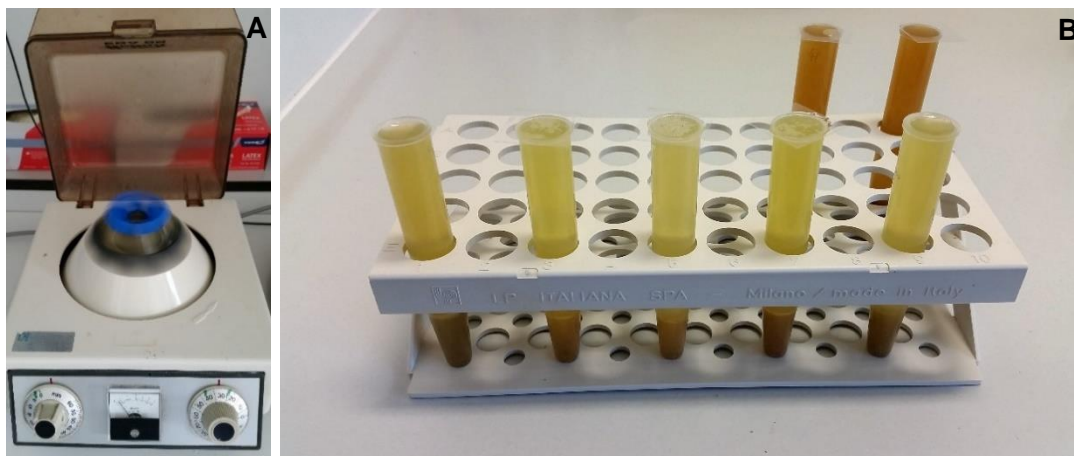
Esta técnica foi utilizada para a pesquisa de quistos de *Giardia* spp., de ovos de nemátodes e céstodes, e de outros protozoários como *Cystoisospora* spp., possibilitando assim a identificação de coinfeções parasitárias.

Esta técnica foi executada segundo o seguinte protocolo (Galindo, Romero, Espuny & de Merced, 2006):

1. Preparou-se a solução concentrada de sulfato de zinco com uma gravidade específica de 1.18, utilizando a proporção de 1000 g de sulfato de zinco para 2500 mL de água. Para o presente estudo, misturou-se num gobelé 280 g de sulfato de zinco em 700 mL de água, com o auxílio de um agitador magnético.
2. Homogeneizaram-se as amostras ainda dentro dos sacos de plástico;
3. Retiraram-se cerca de três gramas de fezes de cada amostra para um copo de plástico e homogeneizou-se com água;
4. Filtraram-se as amostras para tubos de ensaio através de um coador e uma gaze, utilizando um funil, preenchendo os tubos até aos 10 mL;
5. Centrifugou-se a 1800 rpm durante dois minutos; (Figura 16, A).
6. Decantou-se o sobrenadante;
7. Adicionou-se a cada tubo de ensaio uma pequena quantidade de solução de sulfato de zinco e agitou-se até que o sedimento se misturasse;
8. Preencheram-se os tubos até aos 10 mL com a solução anteriormente utilizada e centrifugou-se de novo a 1800 rpm durante dois minutos.
9. Preencheu-se cada tubo até formar um menisco convexo no topo, colocou-se uma lamela sobre este e deixou-se repousar durante, pelo menos, 15 minutos (Figura 16, B).
10. Colocou-se cada lamela sobre uma lâmina de vidro e observou-se ao microscópio ótico com ampliação de 40x, 100x, 400x e 1000x.

Os materiais e equipamentos utilizados para a execução desta técnica foram copos de plástico, uma vareta de vidro, tubos de ensaio e respetivo suporte, coador de rede metálica, gazes, um funil de plástico, um gobelé, agitador magnético, centrífuga, lamelas e lâminas de vidro e um microscópio ótico. Os materiais que entravam em contacto com as várias amostras, foram cuidadosamente lavados com água corrente e detergente entre cada utilização para evitar contaminações cruzadas.

Figura 16 – Flutuação após centrifugação com sulfato de zinco: A) Centrifugação das amostras; B) Preenchimento dos tubos de ensaio até formação de um menisco convexo e colocação das lamelas. Fonte original.



2.4.2. Imunofluorescência direta

Esta técnica foi efetuada para a pesquisa de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., tendo sido utilizado o teste comercial Crypto/*Giardia* Cel® (Cellabs©). Segundo o fabricante, este é um teste *in vitro* que faz a detecção simultânea de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de quistos de *Giardia* spp. em amostras fecais e ambientais. O reagente de anticorpo monoclonal de rato marcado com fluoresceína liga-se, especificamente, aos oocistos e/ou aos quistos presentes na amostra. Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. apresentam-se como estruturas de forma redonda ou oval, com 2 a 6 µm e com fluorescência verde clara. Já os quistos de *Giardia* spp. têm uma forma elíptica, medem 8 a 12 µm e apresentam uma fluorescência verde clara. Por vezes, aparecem fluorescências inespecíficas, mas que podem ser facilmente distinguidas pela sua morfologia. O teste é considerado positivo se for observado, no mínimo, um oocisto e/ou quisto. A sensibilidade, especificidade, repetibilidade e reprodutibilidade deste teste são de cerca de 100%, segundo o fabricante. As amostras fecais utilizadas, podem ser frescas ou conservadas em formalina ou em acetato de sódio - ácido acético - formalina (SAF).

De acordo com as instruções do fabricante, este teste não apresenta reações cruzadas com larvas de *Strongyloides stercoralis*; ovos de *Enterobius vermicularis*, de *Opisthorchis viverrini*, de ancilostomídeos, de *Trichuris trichiura* e de *Hymenolepis nana*; quistos de *Blastocystis hominis*, de *Entamoeba coli*, de *Endolimax nana* e de *Entamoeba hartmanni*; *Eimeria tenella*; *Toxoplasma gondii*; *Trichomonas hominis*; *Cystoisospora belli*; *Microsporidium* sp.; *Pneumocystis carinii*; *Candida* sp.; *Aspergillus* sp.; *Listeria* sp.; *Legionella* sp.; *Erysipelothrix* sp.; *Escherichia* sp.; *Lactobacillus* sp.; *Streptococcus* sp.; *Staphylococcus* sp.; *Bacillus* sp.; *Clostridium* sp.; *Bronchothrix* sp. e *Corynebacterium* sp.

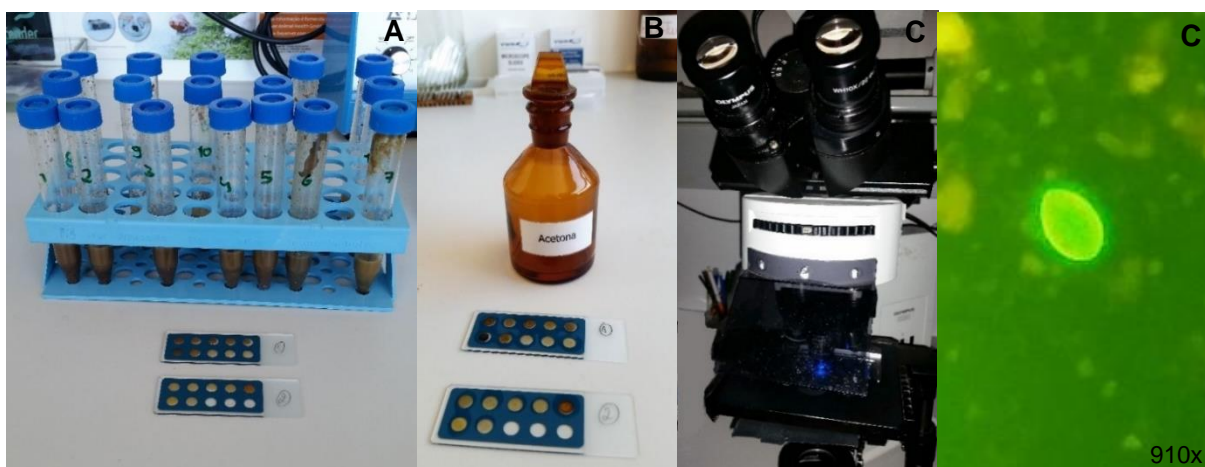
Os materiais necessários para a execução desta técnica foram o reagente Crypto/*Giardia* Cel (RR2) que contém o anticorpo monoclonal marcado, o meio de montagem, uma lâmina de controlo positivo (CONTROL+), lâminas de imunofluorescência (Argene®, BioMérieux©) cada

uma com 10 poços de 6 mm de diâmetro, uma pipeta de precisão para medição até 25 µL, ponteiros para a pipeta, tubos de ensaio e suporte, um agitador vórtex, uma câmara húmida, uma estufa, acetona, tampão fosfato-salino (PBS), lamelas de 24x50 mm, lâminas de imunofluorescência, óleo de imersão não-fluorescente e o microscópio de fluorescência com sistema de filtro para isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Esta técnica foi executada segundo as instruções do fabricante:

1. Num tubo de ensaio, diluiu-se uma pequena quantidade da amostra (o equivalente a uma ervilha) em 1 mL de PBS e homogeneizou-se a mistura (Figura 17, A);
2. Colocaram-se 20 µL da mistura anterior num poço da lâmina de imunofluorescência. Repetiu-se este procedimento para cada amostra, trocando de ponteira entre cada uma, até se completarem todos os poços (Figura 17, A);
3. Colocaram-se as lâminas a secar, completamente, ao ar.
4. Fixaram-se as lâminas em acetona, durante cinco minutos e deixou-se secar novamente ao ar (Figura 17, B);
5. Adicionaram-se 25 µL do reagente RR2 a todas as amostras e à lâmina CONTROL+, abrangendo bem toda a área;
6. Incubaram-se as lâminas a 37 °C em câmara húmida durante 30 minutos, com o cuidado de não deixar secar as lâminas para não ocorrerem ligações não-específicas;
7. Realizou-se uma lavagem das lâminas com PBS, durante um minuto e removeu-se cuidadosamente a humidade à volta dos poços com papel absorvente;
8. Adicionou-se uma gota de meio de montagem a todos os poços e cobriram-se as lâminas com as lamelas;
9. Analisaram-se de imediato as lâminas ao microscópio de fluorescência com comprimento de onda de 450 nm, com uma ampliação de 400x (Figura 17, C).

Figura 17 – Imunofluorescência direta: A) Amostras fecais nos tubos de ensaio após a sua diluição em PBS e de seguida, a sua colocação nos poços das lâminas de imunofluorescência; B) Fixação das lâminas em acetona; C) Observação das lâminas ao microscópio de fluorescência. Fonte original.

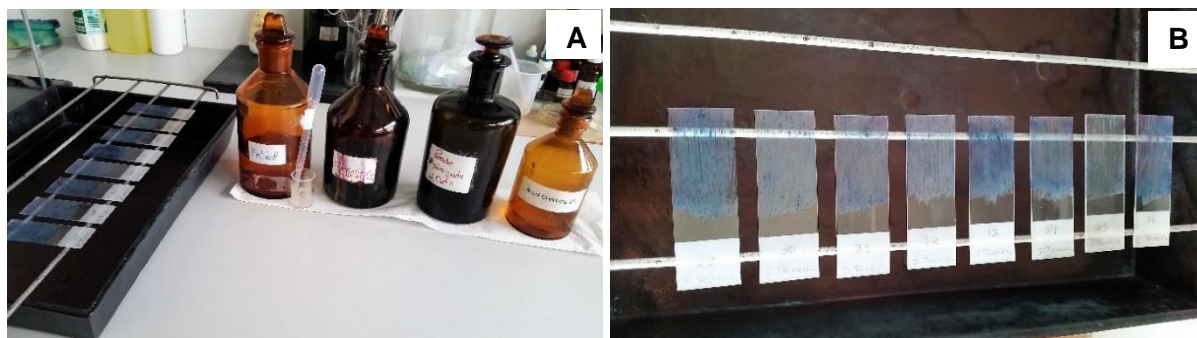


2.4.3. Esfregaço fecal com coloração de Ziehl-Neelsen

Esta técnica foi igualmente utilizada para a pesquisa de quistos de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp.

A execução desta técnica realizou-se de acordo com o protocolo do Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-UL. Inicialmente, homogeneizaram-se as amostras recorrendo a uma vareta de vidro. De seguida, espalhou-se nas lâminas de vidro uma pequena quantidade de amostra, de forma a obter uma camada fina e quase translúcida. As lâminas foram deixadas a secar de um dia para o outro e a coloração foi realizada de seguida: colocou-se a solução de metanol durante um minuto, para fixação das amostras, após a qual se aplicou o corante fucsina. Dez minutos depois, procedeu-se à lavagem das lâminas com água corrente e de seguida com álcool clorídrico a 1%, para remover o excesso de fucsina. Lavou-se novamente com água corrente, sendo então colocado o corante verde malaquite a 0,4%. Ao fim de 30 segundos, lavaram-se as lâminas com água corrente e colocaram-se a secar na vertical num suporte adequado (Figura 18), tendo sido finalmente observadas ao microscópio ótico com óleo de imersão na objetiva de 100x.

Figura 18 – Esfregaço fecal com coloração de Ziehl-Neelsen: A) Lâminas a secar após coloração e reagentes utilizados na sua preparação; B) Lâminas prontas a observar ao microscópio ótico. Fonte original.



2.5. Genotipagem molecular

De forma a determinar os *assemblages*, 10 amostras (provenientes de cães de canil) positivas a *Giardia* spp., tanto pela técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco como por imunofluorescência direta, foram genotipadas em colaboração com o Instituto de Higiene e Medicina Tropical, para a realização de um estudo de genotipagem e análise filogenética de *Giardia* spp. Para tal, procedeu-se à:

- 1) Extração do ADN;
- 2) Amplificação do ADN através da técnica de PCR, tendo como alvo os genes que codificam a glutamato desidrogenase (gdh), triose-fosfato isomerase (tpi) e β -giardina (β -g);
- 3) Sequenciação e análise filogenética.

Através destes resultados, será discutida a importância zoonótica relativa dos animais em estudo.

2.6. Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do *software* R®, versão 3.4.0 (R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Acedido em Dez. 7, 2017, disponível em: <https://www.R-project.org/>). A associação entre a prevalência e os fatores de risco foi realizada com recurso à ferramenta Rcmdr, utilizando tabelas de contingência e o teste Qui-quadrado de Pearson (χ^2). Sempre que este teste não era aplicável (quando mais de 25% das células apresentavam valor esperado inferior a 5), foi utilizado o teste exato de Fisher. Foi considerado um nível de significância (p) de 0,05. As variáveis independentes com um valor de p significativo foram sujeitas a uma análise de regressão logística de forma a identificar fatores de risco e a intensidade da sua associação, através do cálculo do *odds ratio* (OR) e do seu intervalo de confiança de 95%.

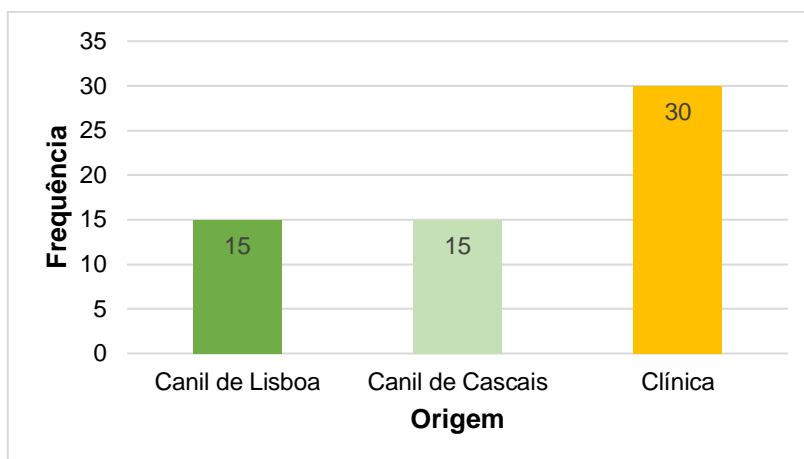
Foi também utilizado o *software* R© para o cálculo das prevalências e dos respetivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%), utilizando o método de Wilson para a prevalência aparente e o método de Blaker para a prevalência real (Reiczigel, Földi, & Ózsvári, 2010). O cálculo das prevalências reais foi realizado tendo em conta os valores da sensibilidade e especificidade do teste de imunofluorescência direta. Tal como em outros estudos, este foi utilizado como teste de referência neste estudo por ser o teste que, na literatura recente, apresenta uma maior performance (ESCCAP, 2018; Geurden et al., 2008; Mirhashemi et al., 2015; Rishniw et al., 2010; CFSPH, 2012; Uehlinger et al., 2017). Assim, a prevalência global e associada aos fatores de risco foi calculada com base neste teste de diagnóstico de forma a obter-se os resultados mais fidedignos. Foi considerado o menor valor de sensibilidade e especificidade encontrado na bibliografia, de forma a que os resultados obtidos se aproximassem o máximo da realidade. Assim sendo, foram considerados os seguintes valores de sensibilidade e especificidade, respetivamente: 91% (Santos, 2016) e 95% (Uiterwijk et al., 2018). Para a comparação dos três métodos de diagnóstico, recorreu-se ao coeficiente de kappa (k). Esta é uma medida que traduz a proporção de concordância, baseando-se nas proporções de resultados positivos e negativos entre os vários métodos (Houe, Ersbøll, Toft, & Kongelige Veterinær-og landbohøjskole, 2004). A interpretação do seu valor foi realizada de acordo com Altman (1991), sendo que valores de $k < 0,00$ representam um grau de concordância nulo, valores de k entre os 0,00 e os 0,20 representam um grau de concordância mínimo, valores de k entre os 0,21 e os 0,40 representam um grau de concordância fraco, valores de k entre os 0,41 e os 0,60 representam um grau de concordância moderado, valores de k entre os 0,61 e os 0,80 representam um grau de concordância bom e valores entre os 0,81 e 1,00 representam um grau de concordância muito bom.

3. Resultados

3.1. Caracterização geral da amostra

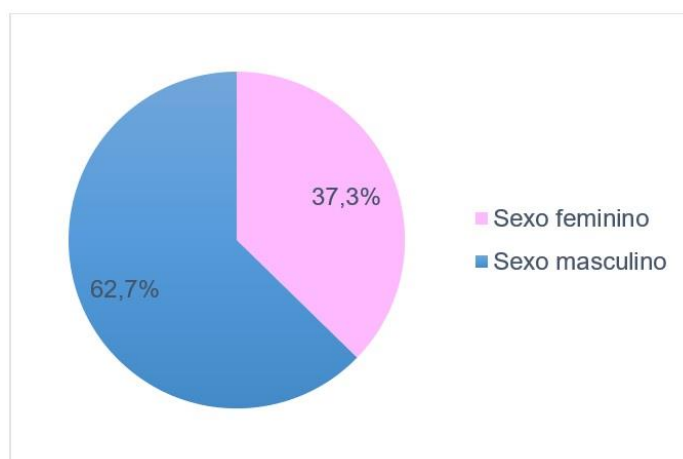
Das 60 amostras, 30 são pertencentes a cães de clínica e as outras 30 são pertencentes a cães de canil. Das 30 amostras pertencentes a cães de canil, 15 foram recolhidas no CRO de Lisboa e as outras 15 no CRO de Cascais. A distribuição das amostras quanto à sua origem está representada no gráfico 1.

Gráfico 1 – Distribuição da amostra em estudo consoante a origem (n=60).



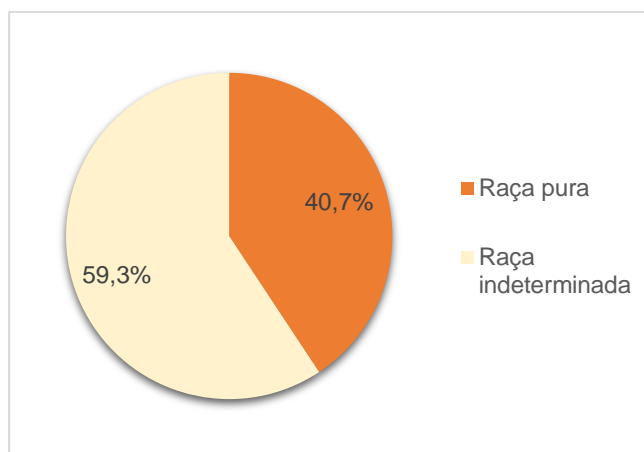
Relativamente ao sexo dos animais, das 60 amostras analisadas, 22 (37,3%) pertenciam a fêmeas, 37 (62,7%) a machos e uma não apresentava essa informação (Gráfico 2). O estado de esterilização dos animais é desconhecido.

Gráfico 2 – Distribuição da amostra populacional em função do sexo (n=59).



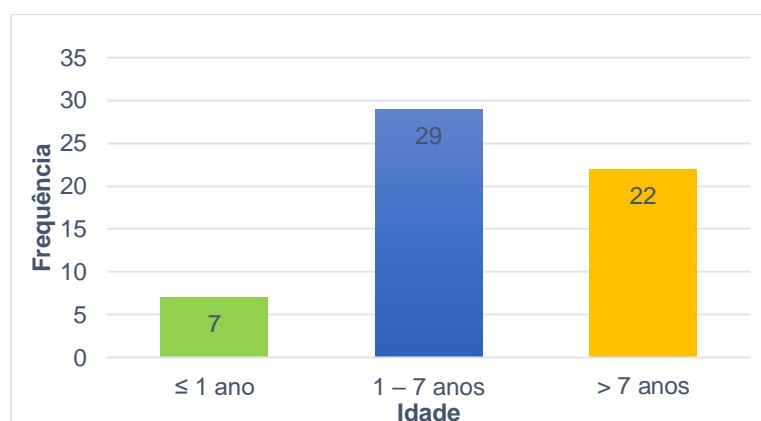
Quanto à raça dos cães, esta foi categorizada em pura e indeterminada. Dos 60 cães, 35 eram de raça indeterminada (59,3%), 24 eram de raça pura (40,7%) e de um deles não se obteve esse dado. A distribuição dos animais consoante a raça encontra-se no gráfico 3.

Gráfico 3 – Distribuição da amostra em estudo consoante a raça (n=59).



Os animais foram organizados em três grupos etários (Gráfico 4): cães jovens, com idade igual ou inferior a um ano; cães adultos, com idade entre um ano e sete anos; e, cães seniores e idosos, com idade superior a sete anos. Das 60 amostras, duas não foram incluídas neste campo, por apresentarem idade desconhecida.

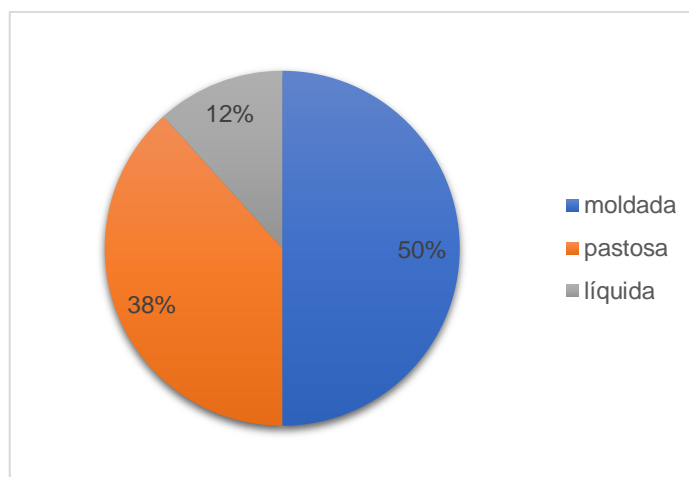
Gráfico 4 – Distribuição dos animais por idade (n=58).



3.2. Observação macroscópica das amostras

À observação macroscópica das fezes, não foram identificados quaisquer parasitas adultos na totalidade das amostras (n=60). Relativamente à consistência fecal, 30 apresentavam-se moldadas (50%), 23 apresentavam-se pastosas (38%) e 7 apresentavam-se líquidas (12%) (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Distribuição das amostras fecais consoante a sua consistência (n=60).



3.3. Análises Parasitológicas

3.3.1. Resultados globais segundo os vários métodos de diagnóstico

Consoante o método de diagnóstico utilizado, as prevalências obtidas também foram diferentes. A prevalência global de *Giardia* spp. foi de 33,3% (20/60) pelo método de IFD, 30% (18/60) pelo método de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco e 16,7% (10/60) pela coloração de Ziehl-Neelsen. Quanto a *Cryptosporidium* spp., as prevalências registadas foram de 5% (3/60), tanto por IFD como pela coloração de Ziehl-Neelsen (Tabela 3).

Tabela 3 – Prevalência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. de acordo com os métodos de diagnóstico utilizados.

<div>Método de Diagnóstico</div> <div>Parasita</div>	IFD nº amostras positivas prevalência % IC 95%	Flutuação Zn nº amostras positivas prevalência % IC 95%	Coloração Ziehl-Neelsen nº amostras positivas prevalência % IC 95%
<i>Giardia</i> spp.	20 33,3% 22,7 - 45,9	18 30% 19,9 - 42,5	10 16,7% 9,3 – 28
<i>Cryptosporidium</i> spp.	3 5% 1,7 - 13,7	—	3 5% 1,7 - 13,7

Legenda: Flutuação Zn - flutuação após centrifugação com sulfato de zinco

3.3.1.1. Concordância estatística entre os vários métodos de diagnóstico

Em relação aos vários métodos utilizados para a detecção de *Giardia* spp., o teste estatístico de Kappa revelou que a concordância estatística entre o método de IFD e a flutuação após centrifugação com sulfato de zinco foi boa, com um valor de $k=0,69$ (IC 95%: 0,49 – 0,89, $p < 0,001$). Já para os métodos de IFD e coloração de Ziehl-Neelsen, obteve-se um valor de $k=0,31$ (IC 95%: 0,03 - 0,60; $p < 0,05$), o que significa que entre estes dois métodos existe uma fraca concordância. O valor de k obtido para os métodos de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco e coloração de Ziehl-Neelsen foi de 0,36 (IC 95%: 0,07 – 0,66, $p < 0,05$), o que indica também uma fraca concordância. Relativamente aos métodos utilizados para a detecção de *Cryptosporidium* spp. (IFD e coloração de Ziehl-Neelsen), obteve-se uma boa concordância entre estes, com um valor de $k=0,65$ (IC 95%: 0,17 – 1,13, $p < 0,001$) (Tabela 4). A combinação de resultados dos vários métodos de diagnóstico utilizados pode ser consultada no Anexo II e III.

Tabela 4 – Grau de concordância estatística entre os vários métodos de diagnóstico utilizados para cada parasita.

<div>Métodos de Diagnóstico</div> <div>Parasita</div>	<div>IFD x Flutuação Zn</div> <div>Valor k (IC 95%) Concordância valor p</div>	<div>IFD x Coloração Ziehl-Neelsen</div> <div>Valor k (IC 95%) Concordância valor p</div>	<div>Flutuação Zn x Coloração Ziehl-Neelsen</div> <div>Valor k (IC 95%) Concordância valor p</div>
<i>Giardia</i> spp.	0,69 (0,49 – 0,89) Boa $p < 0,001$	0,31 (0,03 - 0,60) Frac $p < 0,05$	0,36 (0,07 – 0,66) Frac $p < 0,05$
<i>Cryptosporidium</i> spp.	–	0,65 (0,17 – 1) Boa $p < 0,001$	–

3.3.2. Imunofluorescência direta

3.3.2.1. Resultados globais

De um total de 60 amostras analisadas pelo método de imunofluorescência direta, foram identificadas 20 amostras positivas a *Giardia* spp. (Figura 19, A) e/ou a *Cryptosporidium* spp. (Figura 19, B), o que corresponde a uma prevalência global real de 35,2% e prevalência global aparente de 33,3% (20/60). Relativamente às prevalências individuais de cada parasita, o que registou uma maior prevalência foi *Giardia* spp. com um valor de prevalência real de 35,2% e prevalência aparente de 33,3% (20/60). A prevalência real de *Cryptosporidium* spp. na amostra populacional foi de 3,4% e a prevalência aparente foi de 5% (3/60) (Tabela 5).

Figura 19 – Amostras submetidas a imunofluorescência direta, positivas a *Giardia* spp. (A) e a *Cryptosporidium* spp. (B). Fonte original.

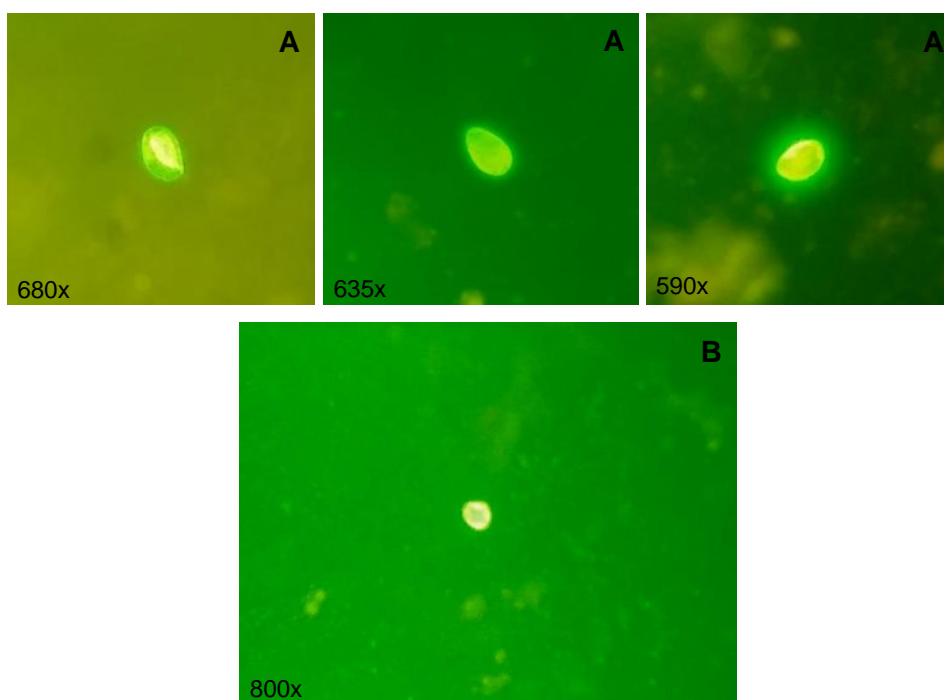


Tabela 5 – Prevalências de *Giardia* spp., de *Cryptosporidium* spp. e prevalência global na amostra populacional, submetida a imunofluorescência direta (n=60).

Parasita	Nº amostras positivas	Prevalência real (IC 95%)	Prevalência aparente (IC 95%)
<i>Giardia</i> spp.	20	35,2% (23,3 – 49,4)	33,3% (22,7 – 45,9)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	3	3,4% ([0] – 13,2)	5% (1,7 – 13,7)
Global ¹	20	35,2% (23,3 – 49,4)	33,3% (22,7 – 45,9)

¹ Amostras positivas a pelo menos um dos protozoários.

3.3.2.2. Infecção por *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. e origem dos cães

3.3.2.2.1. Prevalência da infecção em cães de clínica e de canil

As prevalências registradas em cães de canil foram mais elevadas que em cães de clínica, para ambos os protozoários, mas apenas foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre a infecção por *Giardia* spp. e a origem do animal ($p < 0,001$, $\chi^2 = 19,20$; OR=19,81, IC 95%: 3,84 – 202,13). A prevalência real de *Giardia* spp. em cães de canil foi de 65,2% e a aparente foi de 60% (18/30), enquanto que em cães de clínica a prevalência real foi de 5,2% e a aparente foi de 6,7% (2/30). Relativamente à prevalência de *Cryptosporidium* spp., todas as amostras positivas se registraram em cães de canil, com um valor de 9% para a prevalência real e de 10% para a prevalência aparente (3/30). As diferenças nas prevalências deste último parasita não foram estatisticamente significativas ($p = 0,08$, $\chi^2 = 3,16$) (Tabela 6).

Relativamente à origem dos 20 cães positivos a um e/ou ambos os protozoários, 90% (18/20) eram provenientes de canil e apenas 10% (2/20) eram provenientes de clínica.

Tabela 6 – Prevalência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. e associação estatística (valor p) com a origem (clínica/canil) dos cães.

Parasita \ Origem	Clínica (n=30)	Canil (n=30)
	nº amostras positivas prevalência real % (IC 95%) prevalência aparente % (IC 95%)	nº amostras positivas prevalência real % (IC 95%) prevalência aparente % (IC 95%)
	valor p OR (IC 95%)	
<i>Giardia</i> spp.	2 5,2% (0 – 21,7) 6,7% (1,9 – 21,3)	18 65,2% (45,3 – 82,5) 60% (42,3 – 75,4)
	$p < 0,001$ 19,81 (3,84 – 202,13)	
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0 0% (0 – 10,5) 0% (0 – 11,4)	3 9% (1,6 – 26,5) 10% (3,5 – 25,6)
	$p > 0.05$ –	

3.3.2.2.2. Prevalência da infeção em cães de canis diferentes

A prevalência de *Giardia* spp. no CRO de Lisboa (86,7%) foi superior à prevalência no CRO de Cascais (33,3%), sendo esta uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,003$, $\chi^2=8,90$; OR=11,71, IC 95%: 1,68 – 147,66). Já a diferença da prevalência de *Cryptosporidium* spp. entre os cães do CRO de Lisboa (6,7%) e do CRO de Cascais (13,3%) não foi estatisticamente significativa ($p=0,54$, $\chi^2=8,9$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Prevalência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. e associação estatística (valor *p*) com a origem (CRO Lisboa/CRO Cascais) dos cães.

Parasita \ Origem	CRO Lisboa (n=15) nº amostras positivas prevalência % (IC 95%)	CRO Cascais (n=15) nº amostras positivas prevalência % (IC 95%)
	valor <i>p</i> OR (IC 95%)	
<i>Giardia</i> spp.	13 86,7% (62,1 – 96,3)	5 33,3% (15,2 – 58,2)
	<i>p</i> < 0,05 11,71 (1,68 – 147,66)	
<i>Cryptosporidium</i> spp.	1 6,7% (1,2 – 29,8)	2 13,3% (3,7 – 37,9)
	<i>p</i> > 0,05 –	

3.3.2.3. Infecção por *Giardia* spp., fatores de risco e consistência fecal

3.3.2.3.1. Prevalência de *Giardia* spp. em cães de clínica

Através da análise da tabela 8, pode verificar-se que não se obteve nenhuma amostra positiva proveniente de cães adultos. A prevalência em cães jovens foi de 25% (1/4) e nos cães seniores/idosos foi de 8,3% (1/12), não tendo sido estas diferenças estatisticamente significativas ($p=0,20$, $\chi^2=3,21$).

Relativamente ao sexo, a diferença entre a prevalência no sexo feminino (0%) e no sexo masculino (14,3%) também não foi estatisticamente significativa ($p=0,12$, $\chi^2=2,45$).

Os cães de raça pura registaram uma prevalência de 4,8% (1/21), enquanto os cães de raça indeterminada registaram uma prevalência de 11,1% (1/9), não tendo sido encontrada uma associação estatisticamente significativa entre o fator raça e a infecção por *Giardia* ($p=0,52$, $\chi^2=0,41$).

Quanto à consistência fecal, observa-se que não houve uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,06$, $\chi^2=5,51$) entre os vários tipos de fezes, tendo sido registada uma prevalência de 0% em cães com fezes moldadas (0/20), 14,3% em cães com fezes pastosas (1/7) e 33,3% em cães com fezes líquidas (1/3).

Tabela 8 – Efeito da idade, sexo, raça e consistência fecal na prevalência de *Giardia* spp. em cães de clínica.

Fator	Nº de amostras positivas	Nº total de amostras	Prevalência % (IC 95%)	Valor p OR (IC 95%)
Idade				
≤ 1 ano	1	4	25% (4,6 – 69,9)	$p > 0,05$
1 – 7 anos	0	14	0% (0 – 21,5)	–
> 7 anos	1	12	8,3% (1,5 – 35,4)	
Sexo				
Feminino	0	16	0% (0 – 19,3)	$p > 0,05$
Masculino	2	14	14,3% (4 – 39,9)	–
Raça				
Pura	1	21	4,8% (0,9 – 22,7)	$p > 0,05$
Indeterminada	1	9	11,1% (2 – 43,5)	–
Consistência fecal				
Moldadas	0	20	0% (0 – 16,1)	$p > 0,05$
Pastosas	1	7	14,3% (2,6 – 51,3)	–
Líquidas	1	3	33,3% (6,2 – 79,2)	

3.3.2.3.2. Prevalência de *Giardia* spp. em cães de canil

Como se pode verificar na tabela 9, a maioria das amostras positivas foram provenientes de cães jovens e adultos com prevalências respectivas de 66,7% (2/3) e 73,3% (11/15). A prevalência em cães seniores/idosos foi de 30% (3/10).

Relativamente ao sexo, os cães do sexo feminino registaram uma prevalência de 50% (3/6), enquanto que os cães do sexo masculino registaram uma prevalência de 60,9% (14/23).

A prevalência do parasita na amostra de cães de raça pura foi de 66,7% (2/3) e em cães de raça indeterminada foi de 57,7% (15/26).

Não foi registada uma associação estatisticamente significativa entre a infeção por *Giardia* spp. e nenhum dos fatores idade ($p=0,09$, $\chi^2=4,73$), sexo ($p=0,63$, $\chi^2=0,23$) ou raça ($p=0,77$, $\chi^2=0,09$). Apenas a consistência fecal foi associada de forma estatisticamente significativa com a infeção por *Giardia* spp. em cães de canil ($p=0,03$, $\chi^2=6,93$; OR=7, IC 95%: 1,29 – 37,91), tendo sido obtida uma prevalência de 30% em cães com fezes moldadas (3/10), 68,8% em cães com fezes pastosas (11/16) e 100% em cães com fezes líquidas (4/4).

Tabela 9 – Efeito da idade, sexo, raça e consistência fecal na prevalência de *Giardia* spp. em cães de canil.

Fator	Nº de amostras positivas	Nº total de amostras	Prevalência % (IC 95%)	Valor p OR (IC 95%)
Idade				
≤ 1 ano	2	3	66,7% (20,8 – 93,9)	$p > 0,05$
1 – 7 anos	11	15	73,3% (48,1 – 89,1)	–
> 7 anos	3	10	30% (10,8 – 60,3)	
Sexo				
Feminino	3	6	50% (18,8 – 81,2)	$p > 0,05$
Masculino	14	23	60,9% (40,8 – 77,8)	–
Raça				
Pura	2	3	66,7% (20,8 – 93,9)	$p > 0,05$
Indeterminada	15	26	57,7% (39 – 74,5)	–
Consistência fecal				
Moldadas	3	10	30% (10,8 – 60,3)	$p < 0,05$
Pastosas	11	16	68,8% (44,4 – 85,8)	
Líquidas	4	4	100% (51 – 100)	
Normal	3	10	30% (11 – 60)	OR = 7 (1,29 – 37,91)
Diminuída	15	20	75% (53 – 89)	

3.3.2.4. Infecção por *Cryptosporidium* spp., fatores de risco e consistência fecal

O estudo da associação estatística entre os fatores de risco e consistência fecal e a prevalência de *Cryptosporidium* spp., apenas foi realizado para os cães de canil, uma vez que não foram detetadas amostras positivas nos cães de clínica.

3.3.2.4.1. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em cães de canil

Nesta amostra populacional estudada, não foi observada uma associação estatisticamente significativa entre a infecção por *Cryptosporidium* spp. e a idade ($p=0,39$, $\chi^2=1,87$), sexo ($p=0,35$, $\chi^2=0,87$), raça ($p=0,53$, $\chi^2=0,39$) ou consistência fecal ($p=0,54$, $\chi^2=1,25$), como se pode observar na tabela 10.

Em relação à idade, apenas se obteve amostras positivas nos cães adultos, com uma prevalência de 13,3% (2/15).

A prevalência do parasita na amostra de cães do sexo masculino foi de 13% (3/23), não tendo sido encontrado nos cães do sexo feminino.

Quanto à raça, nenhum animal de raça pura foi positivo, tendo sido registrada uma prevalência de 11,5% (3/26) nos cães de raça indeterminada.

Relativamente à consistência fecal, a prevalência do parasita nos cães com fezes moldadas foi de 10% (1/10), nos cães com fezes pastosas foi de 6,2% (1/16) e nos cães com fezes líquidas foi de 25% (1/4).

Tabela 10 – Efeito da idade, sexo, raça e consistência fecal na prevalência de *Cryptosporidium* spp. em cães de canil.

Fator	Nº de amostras positivas	Nº total de amostras	Prevalência % (IC 95%)	Valor <i>p</i> OR (IC 95%)
Idade				
≤ 1 ano	0	3	0% (0 – 56,2)	<i>p</i> > 0,05
1 – 7 anos	2	15	13,3% (3,7 – 37,9)	–
> 7 anos	0	10	0% (0 – 27,8)	
Sexo				
Feminino	0	6	0% (0 – 39)	<i>p</i> > 0,05
Masculino	3	23	13% (4,5 – 32,1)	–
Raça				
Pura	0	3	0% (0 – 56,2)	<i>p</i> > 0,05
Indeterminada	3	26	11,5% (4 – 29)	–
Consistência fecal				
Moldadas	1	10	10% (1,8 – 40,4)	<i>p</i> > 0,05
Pastosas	1	16	6,2% (1,1 – 28,3)	–
Líquidas	1	4	25% (4,6 – 69,9)	

3.3.3. Flutuação após centrifugação com sulfato de zinco

A prevalência global de parasitas obtidos por esta técnica foi de 36,7% (22/60).

Do total das 60 amostras, 18 revelaram a presença de quistos de *Giardia* spp. (Figura 20); 5 amostras foram positivas a nemátodes da família Ancylostomatidae (Figura 21), cujos géneros não foram identificados; 1 amostra foi positiva ao nemátode da espécie *Toxocara canis* (Figura 22) e 2 amostras foram positivas a protozoários do género *Cystoisospora* spp. (Figura 23).

Figura 20 – Quistos de *Giardia* spp. observados pela técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco. Fonte original.

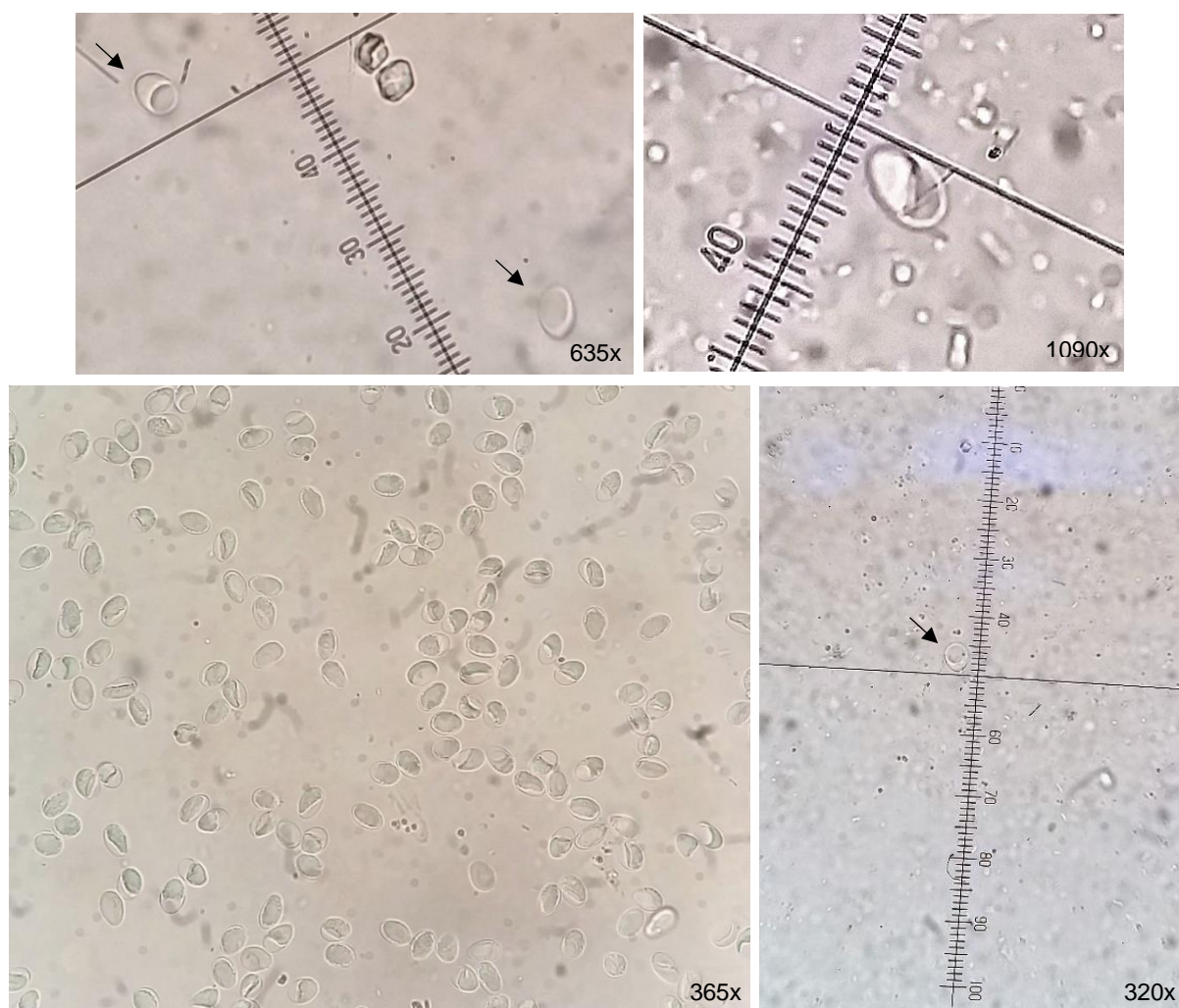


Figura 21 – Ovos de ancilostomídeos em diferentes estadios em amostras submetidas à técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco. Fonte original.



Figura 21 (continuação) – Ovos de ancilostomídeos em diferentes estadios em amostras submetidas à técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco. Fonte original.

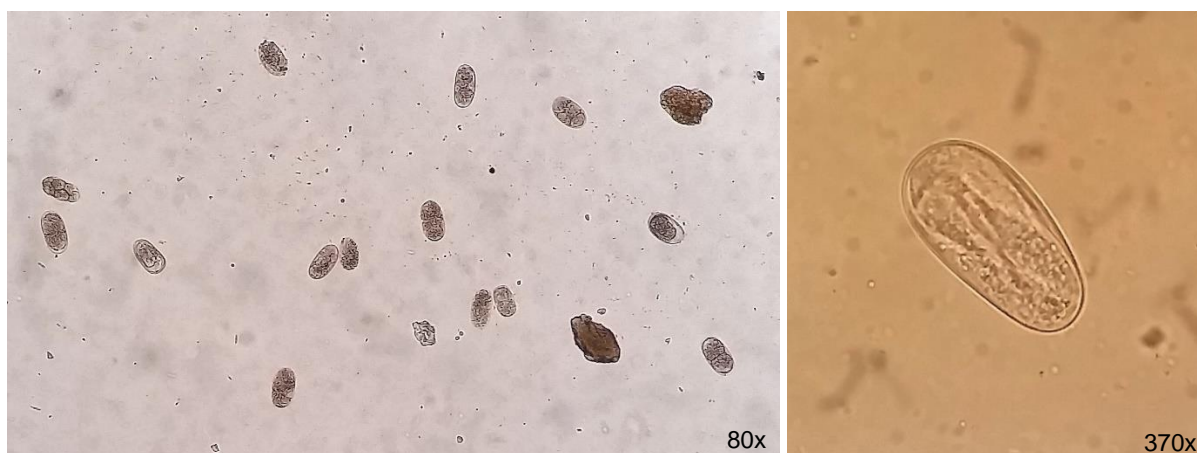


Figura 22 – Amostras submetidas à técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco, positivas a *Toxocara canis*. Fonte original.

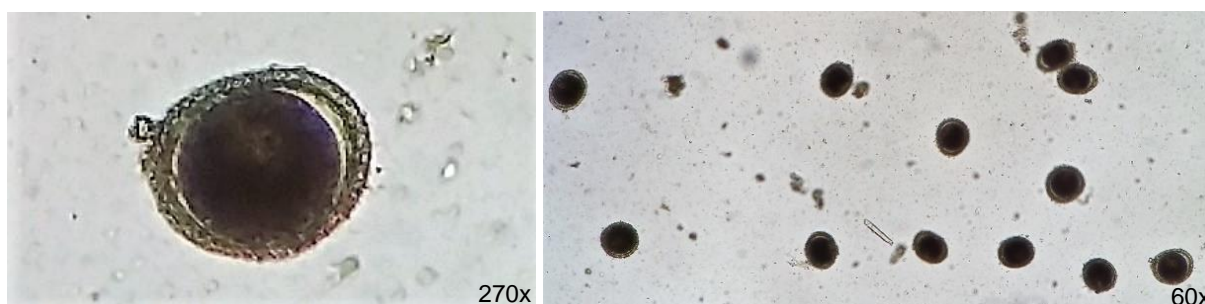


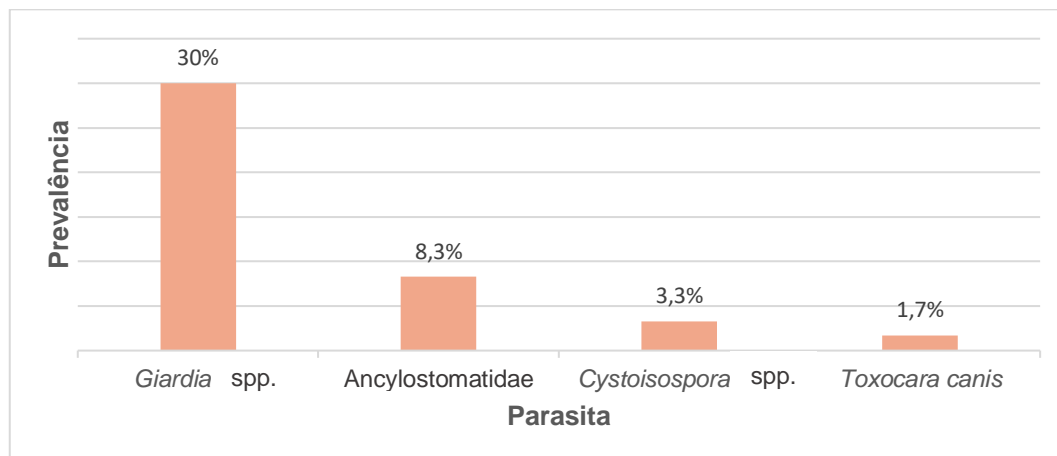
Figura 23 – Amostras submetidas à técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco, positivas a *Cystoisospora* spp. Fonte original.



Os parasitas mais prevalentes foram os protozoários do género *Giardia* spp., com uma prevalência de 30% [IC 95%: 19,9% – 42,5%], de seguida os ancilostomídeos com uma prevalência de 8,3% [IC 95%: 3,6% - 18,1%], de seguida as coccídias do género *Cystoisospora* spp. com uma prevalência de 3,3% [IC 95%: 0,9% - 11,4%], e por fim o

nemátode da espécie *Toxocara canis* com uma prevalência de 1,7% [IC 95%: 0,3% - 8,9%] (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Prevalência dos parasitas intestinais encontrados na amostra populacional submetida à técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco (n=60).



Por se considerar pertinente para este estudo, realizou-se a análise da influência da presença de outros endoparasitas (que não *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.) na consistência fecal dos animais (Tabela 11), verificando-se que existe uma associação estatisticamente significativa entre estas duas variáveis ($p=0,02$, $\chi^2=8,20$).

Tabela 11 – Prevalência de endoparasitas (exceto *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.) consoante a consistência fecal.

	Nº de amostras positivas	Nº total de amostras	Prevalência % (IC 95%)	Valor <i>p</i>
Consistência fecal				<i>p</i> < 0,05
Moldadas	1	30	3,3% (1 – 17)	
Pastosas	4	23	17,4% (7 – 37)	
Líquidas	3	7	42,8% (16 – 75)	

3.3.4. Esfregaço fecal com coloração de Ziehl-Neelsen

Da observação dos esfregaços fecais corados, resultaram 10 amostras positivas a *Giardia* spp. (Figura 24) e 3 amostras positivas a *Cryptosporidium* spp. (Figura 25), o que corresponde a uma prevalência de 16,7% [IC 95%: 9,3% – 28%] e de 5% [IC 95%: 1,7% – 13,7%], respetivamente.

Figura 24 – Quistos de *Giardia* spp. observados pela técnica de esfregaço fecal com coloração de Ziehl-Neelsen. Fonte original.

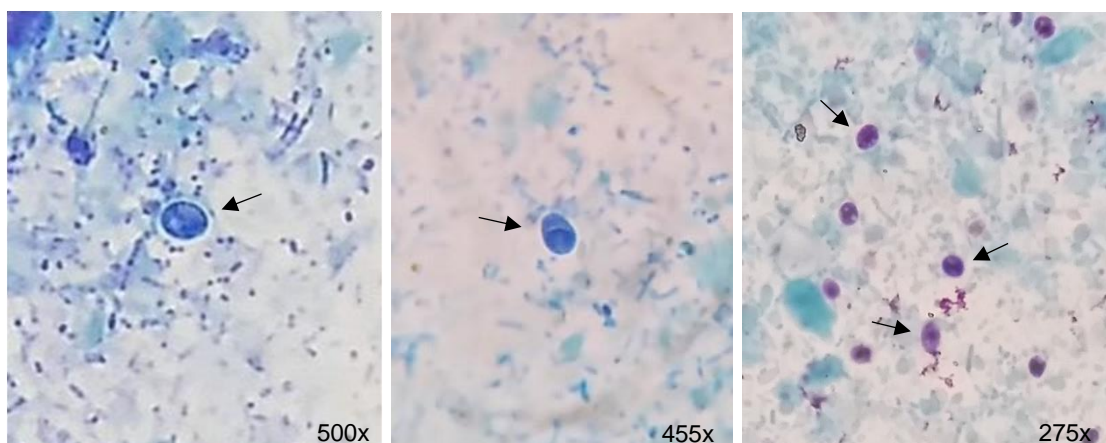
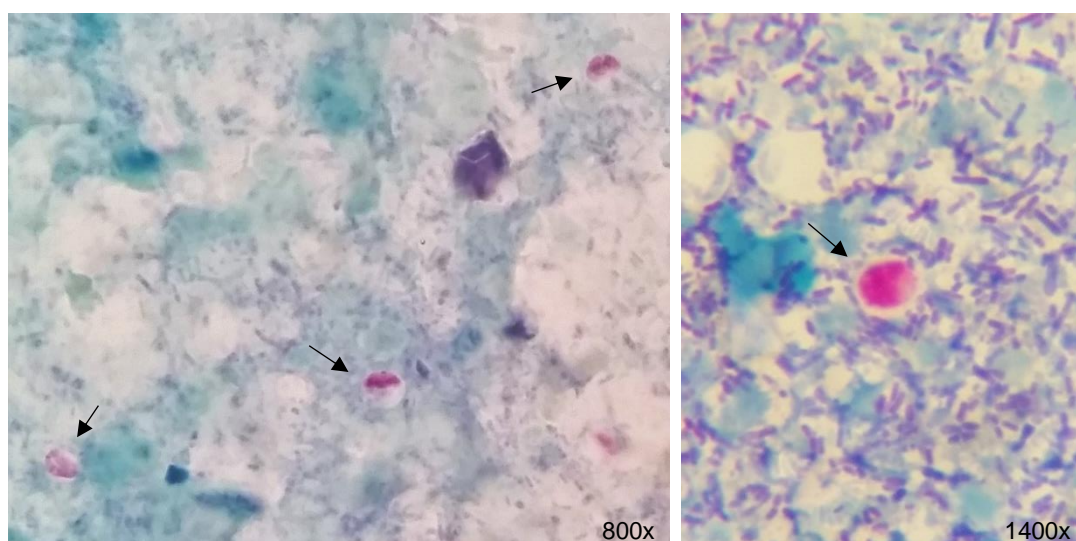


Figura 25 – Oocistos de *Cryptosporidium* spp. observados pela técnica de esfregaço fecal com coloração de Ziehl-Neelsen. Fonte original.



3.3.5. Prevalência global de endoparasitas e associações parasitárias

Das 60 amostras submetidas à IFD e à flutuação após centrifugação com sulfato de zinco, 24 foram positivas a pelo menos um parasita, o que representa uma prevalência global de endoparasitas de 40% [IC 95%: 28,6% - 52,6%].

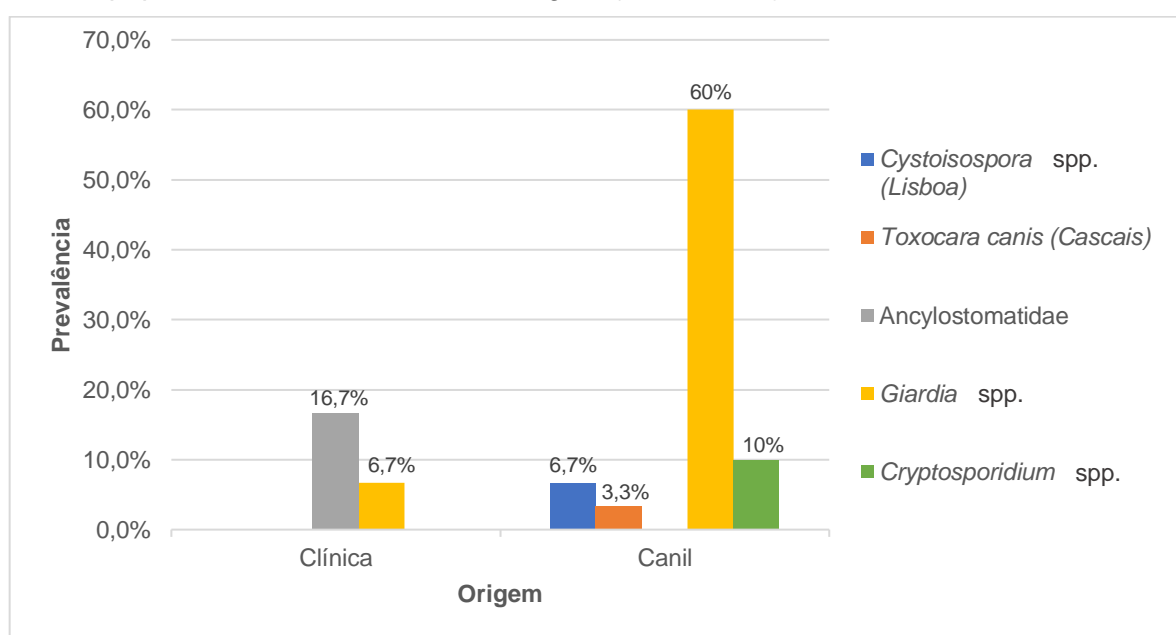
Relativamente à prevalência global de endoparasitas em função da origem dos animais, observou-se que das 30 amostras de cães de canil, pelo menos 18 foram positivas a um endoparasita, resultando numa prevalência de 60% [IC 95%: 42,3% - 75,4%]. Nas 30 amostras de cães de clínica, pelo menos 6 foram positivas a um parasita, resultando numa prevalência global de 20% [IC 95%: 9,5% - 37,3%].

Relativamente à distribuição e à prevalência individual dos endoparasitas na amostra populacional, consoante a sua origem (Gráfico 7), verificou-se que das 30 amostras de cães de canil, 18 foram positivas a *Giardia* spp. (60%; IC 95%: 42,3% - 75,4%), 3 foram positivas a

Cryptosporidium spp. (10%; IC 95%: 3,5 – 25,6), 2 foram positivas a *Cystoisospora* spp. (6,7%; IC 95%: 18,5 – 21,3%) e 1 amostra foi positiva a *Toxocara canis* (3,3%; IC 95%: 0,6 – 16,7). Nos cães de clínica, observou-se que 5 das 30 amostras foram positivas a ancilostomídeos (16,7%; IC 95%: 7,3% - 33,6%) e 2 das 30 amostras foram positivas a *Giardia* spp. (6,7%; IC 95%: 1,9 – 21,3).

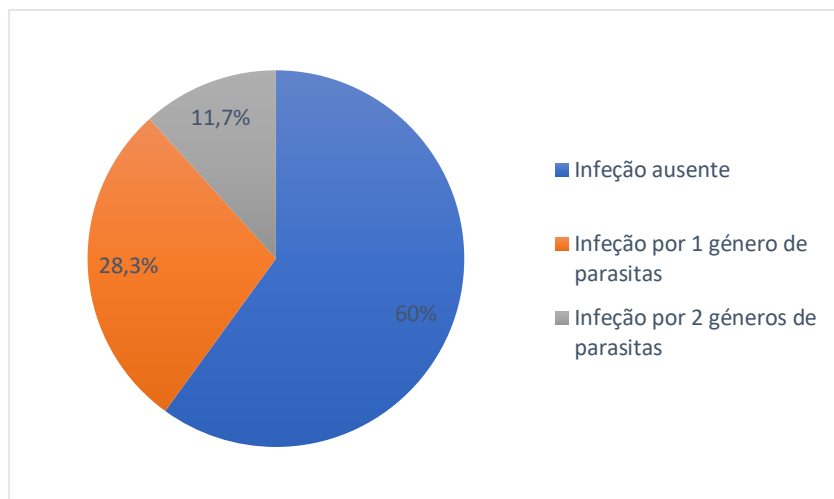
Os cálculos destas prevalências basearam-se apenas nestas duas técnicas pois a IFD foi considerada a técnica de referência para o cálculo da prevalência de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. e a flutuação após centrifugação com sulfato de zinco foi utilizada para o cálculo da prevalência dos restantes endoparasitas.

Gráfico 7 – Distribuição e prevalência individual dos parasitas intestinais encontrados na amostra populacional, consoante a sua origem (clínica/canil).



Como se pode observar no gráfico 8, das 24 amostras positivas a pelo menos um endoparasita, 17 apresentaram parasitas de um género (28,3%) e as restantes 7 apresentaram parasitas de dois géneros diferentes (11,7%).

Gráfico 8 – Distribuição da amostra populacional consoante o tipo de infeção (n=60).



A coinfeção mais frequente foi a de *Giardia* spp. com *Cryptosporidium* spp. e o gráfico 9 mostra uma associação positiva estatisticamente significativa entre estes dois protozoários ($p=0,01$, $\chi^2=6,32$). As outras coinfeções registadas foram: *Giardia* spp. com *Cystoisospora* spp. (Figura 26), *Giardia* spp. com ancilostomídeo e *Giardia* spp. com *Toxocara canis*, cujas frequências absolutas e prevalências estão representadas na tabela 12. As coinfeções foram mais prevalentes em cães de canil (10%) do que em cães de clínica (1,7%) (Tabela 12).

Figura 26 – Coinfeção por *Giardia* spp. (seta) e *Cystoisospora* spp. (asterisco) em amostra submetida à técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco. Fonte original.



Gráfico 9 – Distribuição da amostra populacional (n=60) em função da presença ou ausência da coinfeção de *Giardia* spp. com *Cryptosporidium* spp.

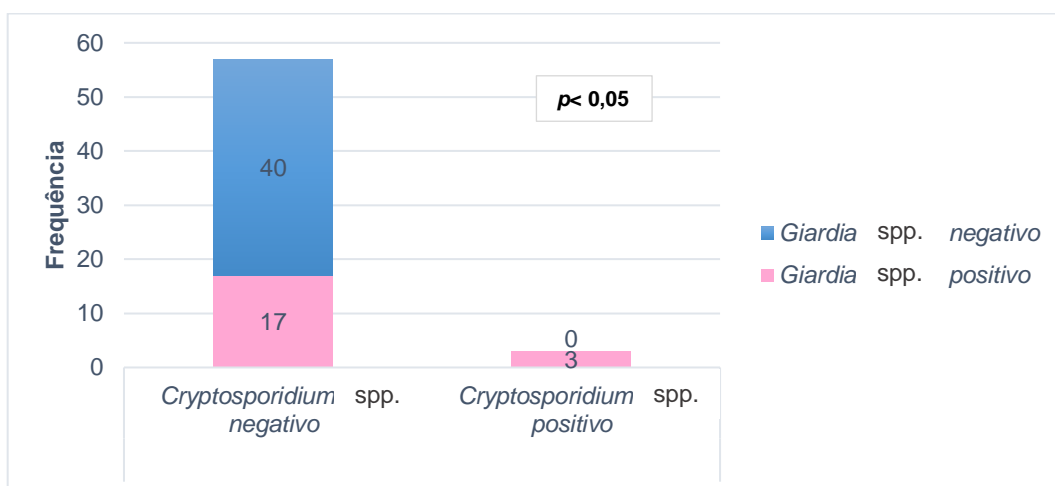


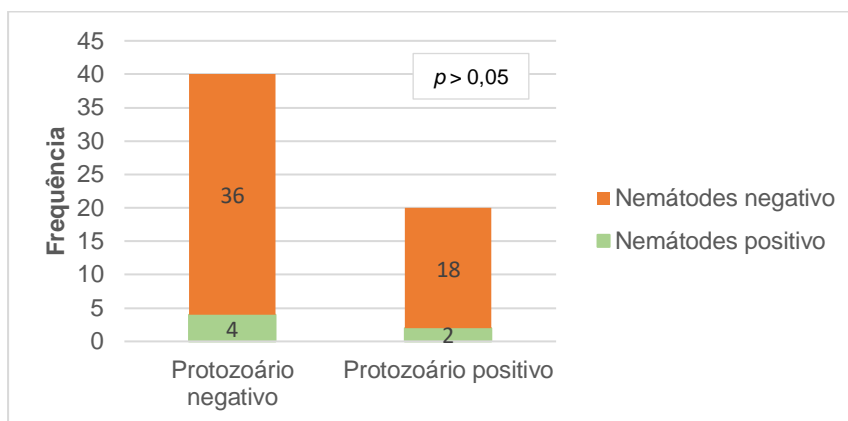
Tabela 12 – Prevalência e origem das coinfeções parasitárias na amostra populacional (n=60).

Coinfeções	Nº de amostras positivas	Origem	Prevalência % (IC 95%)
<i>Giardia</i> spp. + <i>Cryptosporidium</i> spp.	3	Canil	5% (1,7 – 13,7)
<i>Giardia</i> spp. + <i>Cystoisospora</i> spp.	2	Canil	3,3% (0,9 – 11,4)
<i>Giardia</i> spp. + <i>Ancylostomatidae</i>	1	Clínica	1,7% (0,3 – 8,9)
<i>Giardia</i> spp. + <i>Toxocara canis</i>	1	Canil	1,7% (0,3 – 8,9)

3.3.5.1. Influência da presença de nemátodes

Como se pode observar a partir do gráfico 10, das 20 amostras positivas a *Giardia* spp. e/ou *Cryptosporidium* spp., 2 foram positivas a nemátodes (10%). Das restantes 40 amostras negativas a protozoários, 4 também foram positivas a nemátodes (10%). Não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre a infeção por protozoários e a infeção por nemátodes ($p=1$, $\chi^2=0$).

Gráfico 10 – Distribuição das amostras consoante a presença ou ausência de protozoários e de nemátodes (n=60).



3.4. Genotipagem molecular

Da genotipagem das 10 amostras positivas a *Giardia* spp., apenas em 4 se obteve um resultado positivo, uma vez que nas restantes não se obteve nenhum produto de amplificação positivo. Destas 4 amostras, 2 eram provenientes do canil de Lisboa e as outras 2 do canil de Cascais. Das amostras provenientes do canil de Lisboa, uma revelou ser positiva ao *assemblage* C e a outra ao *assemblage* D. Relativamente às 2 amostras provenientes do canil de Cascais, ambas revelaram ser positivas ao *assemblage* D.

4. Discussão

4.1. Resultados globais

Da análise das 60 amostras fecais de cães de clínica e de dois canis do distrito de Lisboa, obteve-se uma prevalência global de *Giardia* spp. de 33,3% (20/60) através da técnica de IFD, 30% (18/60) através da técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco e 16,7% (10/60) através da coloração de Ziehl-Neelsen. Uma revisão de vários estudos a nível mundial (Bouzid et al., 2015) e também a nível nacional, mostrou que os estudos realizados nos países europeus através das técnicas de IFD e da flutuação após centrifugação com sulfato de zinco, no mesmo tipo de população, reportaram prevalências globais semelhantes. Através da técnica de IFD, observaram-se prevalências de 25% na Bélgica (Claerebout et al., 2009) e de 29% na Polónia (Bajer, Bednarska, & Rodo, 2011). Já um estudo realizado em Portugal, no distrito de Bragança, reportou uma prevalência inferior (19,8%) (Leal, 2015). Através da técnica de flutuação, foi reportada uma prevalência de 23,8% num estudo realizado no distrito de Évora (Ferreira et al., 2011), 26,3% em Itália (Pipia et al., 2014) e 38% em Espanha (Ortuño, Scorza, Castellà, & Lappin, 2014). No entanto, outros dois estudos realizados em Itália detetaram prevalências inferiores, de 8,2% (Paoletti et al., 2015) e de 17,3% (Capelli et al., 2006).

Utilizando a coloração de Ziehl-Neelsen, vários estudos nacionais tanto reportaram prevalências mais como menos aproximadas à do presente estudo. Observaram-se prevalências de 11,4% em parques caninos de Lisboa (Ferreira, 2015) e de 17,6% em canis de criação da região de Viseu (Fernandes, 2012). Já em outros estudos, foram detetadas prevalências de 8,5% em espaços públicos de Beja (Nunes, 2014) e de 32,5% em cães errantes do município de Vila Franca de Xira (Santos, 2014).

Quanto a *Cryptosporidium* spp., as prevalências globais registadas foram de 5% (3/60), tanto por IFD como pela coloração de Ziehl-Neelsen. As prevalências de *Cryptosporidium* spp. registadas em outros estudos que recorreram às mesmas técnicas, foram bastante abrangentes. Através da IFD, tanto se registaram prevalências de 2,4% no distrito de Bragança (Leal, 2015), como de 13,5% no Parque Nacional da Peneda Gerês (Silva, 2010) e 17,6% no distrito de Lisboa (Lebre, 2011). Um estudo na Polónia também reportou uma prevalência de 13% (Bajer et al., 2011). Através da coloração de Ziehl-Neelsen, foi detetada uma prevalência de 12% em parques caninos do distrito de Lisboa (Ferreira, 2015) e de 11,25% em cães errantes do município de Vila Franca de Xira (Santos, 2014). Já na República Checa, foi observada uma prevalência de 1,4% em espaços públicos e canis (Dubná et al., 2007) e de 2,8% em cães pastores e de caça, na Grécia (Papazahariadou et al., 2007). Um estudo na área metropolitana de Barcelona, registou uma prevalência global de 6,3% (Gracenea et al., 2009), semelhante à do presente estudo.

Uma vez que os estudos acima mencionados utilizaram as mesmas técnicas de diagnóstico, as maiores discrepâncias observadas devem-se muito provavelmente às diferenças nas condições ambientais, áreas geográficas e altura do ano; diferenças na origem, idade e condição clínica da amostra populacional; e às variações na performance das técnicas, condicionadas pela experiência do operador (Bouzid et al., 2015; Ferreira et al., 2011; Gracenea et al., 2009; Titilincu, Mircean, Achelaritei, & Cozma, 2010).

4.2. Comparação dos vários métodos de diagnóstico

No presente estudo, a técnica de IFD foi utilizada como técnica de referência tal como em outros estudos e em laboratórios especializados, e por ser considerada na literatura recente uma técnica com uma performance superior aos outros métodos de diagnóstico (ESCCAP, 2018; Geurden et al., 2008; Mirhashemi et al., 2015; Rishniw et al., 2010; CFSPH, 2012; Uehlinger et al., 2017).

Ao comparar a técnica de referência com a flutuação após centrifugação com sulfato de zinco, verificou-se que a maior prevalência de *Giardia* foi registada através da IFD (33,3%), o que seria de esperar tendo em conta a maior performance desta técnica. No entanto, a prevalência obtida pela técnica de flutuação foi muito aproximada (30%). Para além disso, estas duas técnicas revelaram uma boa concordância estatística ($k=0,69$, $p<0,001$). Este valor de kappa é superior aos valores obtidos em outro estudo com valores de kappa entre os 0,14 os 0,26

(Rishniw et al., 2010). Já nos estudos de Uiterwijk et al. (2018) e Uehlinger et al. (2017), apesar de o número de amostras ser consideravelmente superior, os valores obtidos são mais aproximados do valor obtido no presente estudo, sendo respetivamente, 0,56 e 0,85.

Apesar da boa concordância estatística, ao analisar a combinação de resultados dos vários métodos de diagnóstico utilizados (Anexo II), observam-se duas discrepâncias entre oito amostras: na primeira, cinco amostras que foram positivas à IFD foram negativas à técnica de flutuação; na segunda, outras três das amostras positivas à técnica de flutuação foram negativas à IFD. Estas discrepâncias podem dever-se a vários fatores. A primeira discrepância deve-se muito provavelmente a uma maior proporção de resultados falsos-negativos da técnica de flutuação, devido à sua menor sensibilidade, e não tanto a resultados falsos-positivos através da IFD, pois uma vez que esta técnica permite tanto uma confirmação imunológica, como uma avaliação morfológica, o risco deste tipo de resultados torna-se reduzido (Scorza & Lappin, 2012). No entanto, sendo a especificidade da IFD mais baixa que a flutuação após centrifugação com sulfato de zinco, a possibilidade de resultados falsos-positivos não pode ser descartada por completo (Uiterwijk et al., 2018). A segunda discrepância pode dever-se a um erro de identificação devido à dificuldade que houve em algumas amostras de distinguir possíveis artefactos e pseudoparasitas dos quistos de *Giardia*, o que pode ter levado a resultados falsos-positivos na técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco. Por outro lado, uma das três amostras positivas a esta técnica e negativa à IFD, foi também positiva à coloração de Ziehl-Neelsen, o que sugere a possibilidade de resultados falsos-negativos na técnica de IFD. O facto do tempo entre a colheita de algumas amostras e o processamento para a técnica de IFD ter sido superior comparativamente ao das outras técnicas, pode ter levado à deterioração de alguns quistos. Uma vez que esta técnica depende da deteção de quistos viáveis e os quistos têm a tendência a deteriorar-se rapidamente nas amostras fecais, o maior tempo até ao seu processamento pode ter afetado a sensibilidade da técnica, produzindo resultados falsos-negativos (Uiterwijk et al., 2018). Outra situação que pode ter levado a resultados falsos-negativos foi o facto de a maioria das amostras ter uma baixa concentração de quistos, o que segundo Coklin et al. (2011) reduz a sensibilidade da técnica de IFD, sendo ainda este facto agravado pela pequena quantidade de amostra utilizada nesta técnica (Santos, 2016). A baixa concentração de quistos foi verificada através da flutuação após centrifugação com sulfato de zinco, que mesmo sendo uma técnica onde ocorre a concentração dos quistos, a visualização destes era muito esporádica, por vezes visualizando-se apenas um quisto em toda a extensão da lâmina.

Comparando a técnica de referência e a técnica de flutuação com a coloração de Ziehl-Neelsen na deteção de *Giardia*, verificou-se que a prevalência registada pela técnica de referência (33,3%) foi o dobro da prevalência registada pela coloração de Ziehl-Neelsen (16,7%) e a concordância entre estas duas técnicas foi fraca ($k=0,31$, $p<0,05$). A prevalência registada pela técnica de flutuação (30%) foi quase o dobro da prevalência registada pela

coloração de Ziehl-Neelsen (16,7%) e a concordância entre estas duas técnicas foi igualmente fraca ($k=0,36$, $p<0,05$). Isto mostra que das três técnicas, esta é a menos eficiente para o diagnóstico deste parasita, o que está de acordo com o facto de apresentar uma baixa sensibilidade, mesmo quando realizada por técnicos experientes. O facto de os quistos de *Giardia* spp. não serem álcool-ácido resistentes, leva a que estas estruturas não sejam tão facilmente identificáveis como os oocistos de *Cryptosporidium* spp. Ao analisar a combinação dos resultados (Anexo II), verificou-se que houve apenas duas amostras que foram positivas à coloração de Ziehl-Neelsen e que foram negativas nas outras técnicas, o que se deve provavelmente a resultados falsos-positivos pelo facto de os quistos também serem mais facilmente confundíveis com artefactos que têm muitas vezes um formato similar e que coram da mesma cor (Ferreira, 2015; Harrington, 2008).

Relativamente a *Cryptosporidium* spp., a prevalência obtida tanto por IFD como pela coloração de Ziehl-Neelsen foi de 5%. Contudo, esta igualdade de valores não corresponde a uma concordância absoluta pois existem duas amostras cujos resultados pelos dois métodos não são coincidentes mas que se anulam. Ou seja, uma amostra foi classificada como positiva por IFD mas negativa pela coloração de Ziehl-Neelsen, enquanto que uma outra amostra foi classificada como negativa por IFD mas positiva pela coloração de Ziehl-Neelsen (Anexo III). Os fatores envolvidos na primeira discrepância são os mesmos que foram descritos para a primeira discrepância de *Giardia*. Já a segunda discrepância tem uma origem mais provável nos resultados falsos-negativos pela técnica de IFD devido ao facto do tempo entre a colheita de algumas amostras e o seu processamento ter sido superior comparativamente ao das outras técnicas. Uma vez que a coloração de Ziehl-Neelsen apresenta uma elevada especificidade para os oocistos de *Cryptosporidium* spp. (CAPC, 2017; ESCCAP, 2018; Zajac & Lindsay, 2004) e as três amostras positivas nesta técnica foram confirmadas por pessoal técnico experiente, é pouco provável que a última discrepância seja um resultado falso-positivo desta técnica. Contudo, a comparação dos dois métodos revelou uma boa concordância estatística ($k=0,65$, $p < 0,001$). Tendo em conta, o mesmo valor de prevalência obtido e a boa concordância entre as duas técnicas, podemos constatar que a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen é uma boa alternativa à IFD para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., pois para além da sua elevada especificidade, de acordo com alguns autores ambas as técnicas apresentam sensibilidades idênticas. Ainda assim, alguns autores encontram sensibilidades mais baixas para esta técnica, o que pode ser magnificado na espécie canina por excretar poucos oocistos (Chalmers et al., 2011; Griffiths, 1998; Manser et al., 2014; Scorza & Lappin, 2012). Para contornar este fator, recomenda-se a colheita de pelo menos três amostras fecais, durante um período de 3 a 5 dias (ESCCAP, 2018; Koehler et al., 2014; Soares & Tasca, 2016).

Quando se comparam técnicas de diagnóstico tem de se ter em conta o objetivo da pesquisa e as limitações de cada técnica. Por exemplo, apesar de a solução de sulfato de zinco com

uma gravidade específica de 1.18 ser a mais indicada para a identificação dos quistos de *Giardia* spp., não permite identificar ovos de *Taenia* spp., uma vez que estes apresentam uma densidade superior. Assim, quando se pretende realizar um exame fecal de rotina, é recomendada a utilização de soluções de sacarose ou de sulfato de zinco com densidades superiores para permitir alargar o leque de pesquisa de parasitas. A flutuação após centrifugação com sulfato de zinco é também uma técnica inadequada para o diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., pois para além da sua sensibilidade ser muito reduzida (21,4%), o facto de os oocistos serem uma das formas parasitárias mais pequenas e flutuarem num plano superior ao dos outros ovos e quistos, torna a sua deteção muito difícil (CAPC, 2017; Mekaru et al., 2007; Zajac & Lindsay, 2004).

Uma vez que tanto *Giardia* spp. como *Cryptosporidium* spp. estão associados a diarreia do intestino delgado e/ou pode haver uma coinfeção, quando se pretende pesquisar estes dois parasitas, como foi o caso no presente estudo, a técnica de IFD é a mais prática pois permite a sua deteção em simultâneo (Scorza & Lappin, 2012). Para contornar uma possível redução da sua sensibilidade pela baixa concentração de quistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*, pode realizar-se a concentração prévia da amostra ou realizar uma análise adicional às amostras negativas à IFD com a técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco (Coklin et al., 2011; Santos, 2016).

Apesar de a IFD ter sido considerada como técnica de referência neste estudo, a semelhança da prevalência obtida pela flutuação após centrifugação com sulfato de zinco na deteção de *Giardia* spp., a igualdade da prevalência obtida pela coloração de Ziehl-Neelsen na deteção de *Cryptosporidium* spp. e a boa concordância entre estas duas técnicas e a IFD, revela que estas técnicas de microscopia convencional são uma boa alternativa à técnica de IFD. Para além disso, devemos ainda ter em conta que neste estudo não foi possível, por questões logísticas, a colheita de pelo menos três amostras fecais durante um período de 3 a 5 dias, como é recomendado pela ESCCAP. Se tal tivesse sido possível, permitiria que as sensibilidades das técnicas de microscopia convencional fossem superiores, podendo a técnica de flutuação ter atingido valores similares ou superiores aos da IFD (94% vs. 91-100%, respetivamente) e consequentemente, a concordância entre as várias técnicas poderia ser também superior. No entanto, para garantir esta performance igualmente elevada ou superior, é necessário um elevado nível de treino e experiência do analista, principalmente para a identificação dos quistos de *Giardia* pela flutuação após centrifugação com sulfato de zinco, uma vez que são dos parasitas mais difíceis de identificar e com mais erros de diagnóstico devido às suas pequenas dimensões e por serem facilmente confundíveis com alguns pseudoparasitas e leveduras (Dryden et al., 2006; ESCCAP, 2018; Scorza & Lappin, 2012; Smith, 2007). Para além deste fator, o tempo de análise de cada amostra pelas técnicas de microscopia convencional é geralmente superior, principalmente quando a concentração de quistos e oocistos é baixa, o que leva a um maior nível de fadiga, podendo resultar em falsos-

negativos ou falsos-positivos. Na técnica de IFD, o nível de experiência e o fator fadiga não são tão relevantes, pois os quistos e oocistos são facilmente identificados pela sua morfologia e fluorescência e apesar do processamento das amostras ser mais moroso, a análise em si é mais rápida. Isto permite obter resultados mais consistentes e fidedignos, o que é uma vantagem nos casos em que a experiência nas técnicas anteriores é um fator limitante (Coklin et al., 2011; Scorza & Lappin, 2012; Uehlinger et al., 2017).

Assim, tendo em conta os resultados obtidos no presente estudo, a sua comparação com outros estudos e assegurando as condições acima descritas, sugere-se que a flutuação após centrifugação com sulfato de zinco e a coloração de Ziehl-Neelsen apresentam um custo-benefício superior relativamente à IFD no diagnóstico laboratorial destes dois parasitas, pois, apesar de não serem uma alternativa tão prática, podem atingir sensibilidades e especificidades superiores ou semelhantes, permitem a identificação de outros parasitas, que poderão estar também a contribuir para o quadro clínico do animal, e são mais económicas. Uma vez que o fator económico tem bastante peso nos canis, o diagnóstico destes dois parasitas neste contexto, é também mais adequado através das técnicas de microscopia convencional. Relativamente ao diagnóstico nas clínicas veterinárias, estas técnicas tornam-se inviáveis uma vez que: i) o nível de treino e experiência necessário para uma correta avaliação microscópica para a técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco é, na maioria dos casos insuficiente por parte dos clínicos e para o atingir seria necessário um longo período de treino; ii) a necessidade de executar várias análises microscópicas consecutivas, para aumentar a sua sensibilidade, para além de consumir muito tempo de expediente, requer uma elevada *compliance* por parte dos tutores, sendo pouco prático no contexto de clínica e; iii) a necessidade de equipamento especializado e o elevado custo dos testes comerciais de IFD, inviabilizam a sua utilização no diagnóstico clínico de rotina (Papini & Cardini, 2006; Soares & Tasca, 2016; Uehlinger et al., 2017). Assim, é sugerido por vários autores, a utilização dos testes de imunocromatografia como uma alternativa rápida e prática ao diagnóstico laboratorial por microscopia ótica ou por IFD, uma vez que permite o diagnóstico na clínica e em poucos minutos, sem necessidade de equipamento adicional e de pessoal com treino ou experiência específicos. Para além disso, são testes fiáveis e com uma boa performance, e apesar de terem um custo mais elevado relativamente às técnicas de microscopia ótica, são ainda assim acessíveis, apresentando um custo-benefício relevante para o diagnóstico em clínicas veterinárias (Dryden et al., 2006; Geurden et al., 2008; Uehlinger et al., 2017). Ainda assim, Geurden et al. (2008) sugere que, tal como para as técnicas de microscopia, seja realizada a análise proveniente de uma amostragem múltipla, para compensar a menor sensibilidade comparada à técnica de IFD.

4.3. Prevalência e fatores de risco

4.3.1. Origem

A prevalência de *Giardia* spp. nos animais de canil foi de 60% (18/30) e nos animais de clínica foi de 6,7% (2/30). A origem dos animais foi considerada um fator de risco para a infeção por *Giardia* spp., tendo sido os animais de canil muito mais suscetíveis à infeção do que os animais de clínica ($p < 0,001$; OR=19,81, IC 95%: 3,84 – 202,13). Estes resultados estão de acordo com estudos de outros autores (Bugg, Robertson, Elliot, & Thompson, 1999; Huber, Bomfim, & Gomes, 2005; Leal, 2015; Paoletti et al., 2015; Pipia et al., 2014; Sommer, Rupp, Pietsch, Kaspar, & Beelitz, 2018) que também encontraram uma associação estatisticamente significativa entre a origem dos cães e a infeção por *Giardia* spp., com um risco acrescido para os animais de canil e níveis de positividade substancialmente mais elevados.

Esta diferença deve-se ao facto de as condições de sobredensidade animal e de menor higiene presentes nos canis e as admissões diárias de animais de diferentes origens promoverem uma elevada contaminação ambiental, facilitando a transmissão fecal-oral e, assim, aumentando o risco de infeção e reinfeção (Paoletti et al., 2015; Sommer et al., 2018). A disseminação de *Giardia* nos canis está também associada aos fatores de *stress* (por exemplo, sobredensidade, isolamento, ambiente ou barulhos estranhos, alterações na dieta e atividade física limitada) e às deficiências nutricionais mais características destes ambientes, que podem levar a um desequilíbrio da resposta imunitária a nível global e a nível intestinal (Pipia et al., 2014; Raza et al., 2018). Para além disso, este protozoário apresenta um período pré-patente muito curto, resistência a desinfetantes, resistência às condições ambientais e mantém-se infetante durante semanas a meses. Todas estas características biológicas e epidemiológicas são responsáveis pela sua elevada prevalência e distribuição generalizada nos canis (Bajer et al., 2011; Beelitz et al., 2006; Moron-Soto et al., 2017).

A prevalência de *Giardia* spp. nos animais de canil aproxima-se dos 55,9% obtidos no estudo de Lebre (2011). A semelhança dos resultados pode justificar-se pelo facto de a área geográfica estudada ser a mesma, um dos canis incluído no estudo ser o mesmo e o manejo dos animais ser similar. Um estudo realizado em outra área geográfica de Portugal, em Évora, e outro realizado na Catalunha, Espanha, detetaram prevalências muito semelhantes em cães de canil, respetivamente, 61,2% (Ferreira et al., 2011) e 63% (Ortuño et al., 2014). Outros estudos realizados em canis, a nível europeu, também reportaram prevalências próximas à do presente estudo: 40,6% em Barcelona (Ortuño & Castellà, 2011); 35,8% em Itália (Pipia et al., 2014); 43,9% na Bélgica (Claerebout et al., 2009) e 46,7% na Alemanha (Sommer et al., 2018). No entanto, também foram reportadas prevalências inferiores em Portugal e em outros países europeus: 23,7% no distrito de Bragança (Leal, 2015); 5,2% em Itália (Paoletti et al., 2015); 11,4% na Alemanha (Becker, Rohen, Epe, & Schnieder, 2012) e 21% em Londres (Upjohn et al., 2010).

Das 30 amostras de cães de clínica, apenas 2 foram positivas a *Giardia* spp. (6,7%). Este valor encontra-se entre os 1,3% no distrito de Évora (Ferreira et al., 2011), 4,2% no distrito de Bragança (Leal, 2015) e os 11,7% na cidade do Porto (Neves et al., 2014). Outros estudos realizados a nível europeu, na mesma população canina, também reportaram prevalências próximas à do presente estudo: 3% em Itália (Paoletti et al., 2015); 16,7% na região norte e centro de Itália (Capelli et al., 2006); 17,9% na ilha Sardenha; 9,3% na Bélgica (Claerebout et al., 2009); 5% na Finlândia (Rimhanen-Finne et al., 2007) e 15% na Suécia (Santos, 2016). Já a prevalência de 24,8% apresentada por Epe et al. (2010), num estudo realizado em 377 clínicas de 7 países da União Europeia, é superior aos valores apresentados anteriormente, incluindo o do presente estudo.

Relativamente a *Cryptosporidium* spp., as únicas três amostras positivas foram provenientes de cães de canil, o que resultou numa prevalência de 10% para estes (3/30) e de 0% (0/30) para os cães de clínica. Não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre a origem dos animais e a infeção por *Cryptosporidium* spp. ($p=0,08$, $\chi^2=3,16$), o que está de acordo com os estudos de Gracenea et al. (2009), Huber et al. (2005) e Leal (2015). Já nos estudos de Dubná et al. (2007) e de Titilincu, Mircean, Achelaritei e Cozma (2010), a origem dos animais foi considerada um fator de risco, com uma probabilidade de infeção mais elevada nos cães de canil.

A prevalência de *Cryptosporidium* spp. em cães de canil obtida neste estudo foi muito próxima das prevalências detetadas no canil de Vila Franca de Xira e em canis do distrito de Beja, sendo respetivamente, 11,25% (Santos, 2014) e 12% (Braga, 2017). Contudo, em outros estudos tanto portugueses como europeus encontramos prevalências muito variáveis, desde: 3,1% no distrito de Bragança (Leal, 2015); 17,6% na cidade de Lisboa (Lebre, 2011); 0% na região central de Itália, 1,4% na República Checa (Dubná et al., 2007), 5,9% em Barcelona (Gracenea et al., 2009) e 46,2% (Titilincu et al., 2010). A ausência de amostras positivas a *Cryptosporidium* spp. em cães de clínica vai ao encontro aos estudos de Leal (2015), de Paoletti et al. (2015) e de Batchelor et al. (2008) que registaram prevalências de 0%, 0,2% e 0,6%, respetivamente. Outros países europeus reportaram prevalências de 8,6% em Barcelona (Gracenea et al., 2009), 8,7% na Holanda (Overgaaauw et al., 2009) e 5% na Finlândia (Rimhanen-Finne et al., 2007).

Apesar de haver bastantes estudos com valores de prevalência concordantes com os do presente estudo, outros apresentam prevalências variáveis, o que se deve ao facto da prevalência destes dois protozoários não ser consistente entre os vários estudos (Ferreira et al., 2011). Uma vez que nos estudos acima mencionados a população canina era a mesma do presente estudo, estas variações devem-se, principalmente, à sensibilidade do método de diagnóstico utilizado e, em seguida, à variação na área geográfica (Bouzid et al., 2015; Titilincu et al., 2010). Outros fatores que também poderão ter condicionado estas variações, para além dos mencionados anteriormente, são frequência de desparasitação; a presença de infeção

por nemátodes; o número de animais por *box* e o número de cães do canil (Bajer et al., 2011; Bugg et al., 1999); o tempo de permanência no canil (Scaramozzino et al., 2009); a proveniência dos animais (adoção, criador ou rua) (Epe et al., 2010); o número de cães em casa (Bugg et al., 1999); o acesso ao exterior e o contacto com outros animais (Olabanji, Maikai, & Otolorin, 2016; Traub et al., 2009).

Os dois canis escolhidos para este estudo, apresentaram diferenças em alguns aspetos, os quais pretendemos relacionar com a prevalência dos dois protozoários. Entre estes aspetos temos: o número de animais, o plano de desparasitação e o plano de higienização.

Comparando os dois canis, o canil com maior prevalência de *Giardia* spp. foi o CRO de Lisboa, com 86,7% (13/15), contra uma prevalência de 33,3% (5/15) no CRO de Cascais, tendo sido esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,003$, $\chi^2=8,90$). Como se pode observar pela tabela 7, a proveniência do CRO de Lisboa foi considerado um fator de risco para a infeção por *Giardia* spp., tendo os animais provenientes deste CRO um risco 11,71 vezes superior de infeção comparativamente aos animais do CRO de Cascais (OR=11,71, IC 95%: 1,68 – 147,66).

Como referido anteriormente, o número de animais no CRO de Lisboa é muito superior ao do CRO de Cascais (170 vs. 45). De acordo com Bajer et al. (2011), o tamanho do canil e o número de animais do mesmo foi um dos fatores que mais influenciou a prevalência de *Giardia* spp., tendo reportado o dobro da prevalência em canis maiores e com mais animais. Assim, estes dados vão ao encontro aos resultados do presente estudo, uma vez que o CRO de Lisboa reportou também mais do dobro da prevalência comparativamente ao CRO de Cascais.

Relativamente ao plano de desparasitação, apesar de esta ser realizada com o mesmo tipo de anti-helmínticos, é realizada com mais frequência no CRO de Lisboa (de 3 em 3 meses) do que no CRO de Cascais (de 6 em 6 meses). No estudo de Bajer et al. (2011), a frequência de desparasitação foi o fator que mais influenciou a prevalência de protozoários, havendo uma associação significativa entre o aumento da frequência da administração de anti-helmínticos e o aumento da prevalência de protozoários. Este fenómeno foi observado pela primeira vez por Bugg et al. (1999), que também sugeriu que os protozoários, que não são sensíveis aos anti-helmínticos comuns, colonizam o nicho libertado pela eliminação dos nemátodes intestinais sensíveis à terapêutica, o que terá levado a que *Giardia* spp. se tenha tornado o parasita intestinal mais frequente dos cães. Assim, a maior prevalência de *Giardia* spp. no CRO de Lisboa vai ao encontro ao que é expectável, segundo estes estudos.

Apesar de não ter sido encontrada uma associação estatisticamente significativa ($p=1$, $\chi^2=0$) entre a presença dos protozoários *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. e a presença de nemátodes (gráfico 10), este facto pode, ainda assim, ter influenciado a maior prevalência de *Giardia* spp. no CRO de Lisboa. Como observado pelo gráfico 7, apenas no CRO de Cascais foi detetada infeção por nemátodes, enquanto no CRO de Lisboa onde a prevalência de

Giardia foi superior, não se encontrou nenhuma infecção por nemátodes e sim apenas com outros protozoários (*Cystoisospora* spp.). Este facto é concordante com a frequência de desparasitação nestes dois canis e com a explicação avançada por Bugg et al. (1999), sendo que no CRO de Cascais onde a frequência de desparasitação é menor, é onde há infecção por nemátodes e uma menor prevalência de *Giardia*; no CRO de Lisboa onde a frequência de desparasitação é superior, não se encontrou nenhuma amostra positiva a nemátodes e há uma maior prevalência de *Giardia* e outros protozoários, inclusive.

O plano de higienização e limpeza também difere de um canil para o outro na medida em que no CRO de Cascais realizam duas limpezas diárias enquanto no CRO de Lisboa só realizam uma. Apesar de os produtos de desinfecção utilizados nos dois canis não serem eficazes para o controlo de *Giardia*, uma vez que os quistos não são sensíveis ao cloro (Claerebout, 2018), a frequência da limpeza pode ter tido influência na sua prevalência. O facto de no CRO de Cascais a limpeza ser realizada duas vezes por dia, leva a que haja uma remoção mais rápida das fezes e uma limpeza mecânica do pavimento mais regular. Consequentemente, há uma eliminação mais frequente dos quistos de *Giardia*, uma menor sobrevivência do parasita e uma menor contaminação ambiental, o que é concordante com uma menor prevalência (ESCCAP, 2018; Raza et al., 2018).

Podemos assim considerar que o número de cães do canil, a frequência de desparasitação e de limpeza são fatores importantes na manutenção e transmissão da infecção por *Giardia* spp. Relativamente a *Cryptosporidium* spp., a prevalência mais elevada foi registada no CRO de Cascais (13,3%), comparativamente ao CRO de Lisboa (6,7%), ao contrário de *Giardia* spp., não tendo sido esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,54$, $\chi^2=8,9$). No estudo de Bajer et al. (2011) também não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa entre a prevalência de *Cryptosporidium* spp. e o tamanho dos canis.

4.3.2. Idade

A idade tem sido descrita por vários autores como fator de risco para a infecção por *Giardia*, tanto em cães de canil como em cães de clínica, com uma prevalência significativamente superior em cães jovens com menos de 6 meses (Epe et al., 2010; Neves et al., 2014), com menos de um ano de idade (Batchelor et al., 2008; Claerebout et al., 2009; Paoletti et al., 2015; Pipia et al., 2014; Rimhanen-Finne et al., 2007; Sommer et al., 2018; Traub et al., 2009; Upjohn et al., 2010) e com menos de 5 anos (Papini et al., 2005). Um estudo realizado em Portugal em cães com idade inferior a um ano também demonstrou que a infecção é mais prevalente entre os dois e os seis meses de idade (Maia, Nogueira, Mendão, & Cardoso, 2013). No entanto, outros autores, para além de terem reportado uma maior prevalência de *Giardia* nos animais jovens, também detetaram um aumento da prevalência nos animais mais velhos (Bajer et al., 2011; Gates & Nolan, 2009). A maior prevalência nos cães jovens e nos

cães mais velhos deve-se à imaturidade (Neves et al., 2014) e ao comprometimento do sistema imunitário (Gates & Nolan, 2009), respetivamente.

Apesar destas referências, não foi encontrada qualquer associação estatisticamente significativa entre a idade dos animais e a prevalência de *Giardia* no nosso estudo, tanto em cães de clínica como de canil (Tabela 8 e 9). No entanto, uma vez que as únicas amostras positivas de cães de clínica pertenciam a animais jovens e seniores/idosos, podemos considerar que estes resultados estão de acordo com as maiores prevalências obtidas para estes grupos nos estudos acima referidos. No estudo de Papazahariadou et al. (2007) e de Gracenea et al. (2009) também foi reportada uma prevalência superior nos cães jovens, sem que tenha sido encontrada uma associação estatisticamente significativa. O mesmo sucedeu no estudo de Bajer et al. (2011) mas para cães com mais de 8 anos.

Já nos cães de canil, não se verificou esta tendência uma vez que a prevalência de *Giardia* spp. em cães adultos foi superior à prevalência nas amostras de cães jovens. O facto de o número de amostras de cães adultos (15/30) ter sido bastante superior ao número de amostras de cães jovens (3/30), poderá ter contribuído para este resultado, o que sucedeu no estudo de Fernandes (2012), Huber et al. (2005) e Lebre (2011), também em cães de canil. Ou seja, mesmo com um número de amostras bastante reduzido, as amostras de cães jovens apresentaram uma prevalência elevada e próxima da prevalência nas amostras de cães adultos (66,7% vs. 73,3%), o que sugere que se as amostras tivessem distribuídas de forma equitativa, a prevalência nos cães jovens provavelmente seria superior. No estudo de Oliveira-Sequeira, Amarante, Ferrari e Nunes (2002), apesar de ter sido encontrada uma associação estatisticamente significativa entre os cães adultos e a infeção por *Giardia* spp., também o número de amostras de cães jovens foi muito reduzido comparativamente ao número de amostras de cães adultos. Para além disso, o facto de a maioria dos cães adultos ter sido proveniente de canis pode ter levado ao aumento da prevalência neste grupo etário pela maior prevalência obtida nos cães de canil, e não tanto pelo fator idade.

Relativamente a *Cryptosporidium* spp., também não foi encontrada qualquer associação estatisticamente significativa entre a idade e a infeção por este protozoário, o que vai ao encontro aos estudos de Leal (2015), Lebre (2011) e Santos (2014). Também estudos realizados em outros países vão ao encontro a este resultado (Gracenea et al., 2009; Huber et al., 2005; Papazahariadou et al., 2007). Contudo, outros autores encontraram uma associação estatisticamente significativa entre a idade e infeção por este protozoário, com uma maior prevalência em cães com menos de 6 meses (Hamnes et al., 2007) e com menos de um ano de idade (Rimhanen-Finne et al., 2007; Titilincu et al., 2010).

4.3.3. Sexo

A maioria dos estudos, tanto portugueses como internacionais, sugere a inexistência de uma associação estatisticamente significativa entre o sexo dos cães e a infeção por *Giardia* spp. e

Cryptosporidium spp., tanto em cães de clínica como de canil (Bugg et al., 1999; Claerebout et al., 2009; Epe et al., 2010; Gracenea et al., 2009; Hamnes et al., 2007; Huber et al., 2005; Leal, 2015; Lebre, 2011; Papazahariadou et al., 2007; Santos, 2014; Sommer et al., 2018; Titilincu et al., 2010; Upjohn et al., 2010). Os resultados do presente estudo estão de acordo com estes estudos, uma vez que não foi detetada qualquer associação estatisticamente significativa entre este fator e a infeção por estes dois protozoários, nos dois grupos de animais estudados (Tabela 8, 9 e 10).

A prevalência da infeção por *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. foi superior nas amostras de cães do sexo masculino. Os estudos realizados por Epe et al. (2010), Gracenea et al. (2009) e Mosallanejad et al. (2010) também reportaram uma maior prevalência nos cães do sexo masculino sem que esta tenha sido estatisticamente significativa. No entanto, outros autores também encontraram uma maior prevalência em fêmeas, alguns dos quais relacionaram com a possível redução da imunidade em determinadas alturas do ciclo fisiológico das fêmeas (Fernandes, 2012; Olabanji et al., 2016; Pipia et al., 2014; Upjohn et al., 2010). Vários estudos também encontram uma prevalência significativamente superior de *Giardia* nos animais não esterilizados, o que sugere a influência do fator hormonal acima referido (Oliveira-Sequeira, Amarante, Ferrari, & Nunes, 2002; Upjohn et al., 2010). Teria, assim, sido interessante estudar este fator para estabelecer uma possível associação.

4.3.4. Raça

Não foi detetada qualquer associação estatisticamente significativa entre a presença de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. e a raça, tanto em cães de clínica como de canil. Devemos, ainda assim, considerar que a grande discrepância entre o número de amostras de raça pura e o número de amostras de raça indeterminada, principalmente em cães de canil, pode ter inviabilizado uma análise adequada.

A maioria dos estudos não encontra uma associação estatisticamente significativa entre a infeção por *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. e a raça dos cães, nas várias populações caninas (Claerebout et al., 2009; Gracenea et al., 2009; Mosallanejad, Hamidinejat, Avizeh, Ghorbanpoor Najafabadi, & Razi Jalali, 2010; Neves et al., 2014; Olabanji et al., 2016; Oliveira-Sequeira et al., 2002; Papini et al., 2005). Contudo Fontanarrosa, Vezzani, Basabe e Eiras (2006) e Titilincu et al. (2010) reportaram uma associação estatisticamente significativa entre a infeção por *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. e a raça dos cães. Também Upjohn et al. (2010) encontraram uma associação inesperada entre a infeção por *Giardia* e a raça Rottweiler.

Fontanarrosa et al. (2006) consideraram que as variáveis “raça pura ou indeterminada” e “ter ou não ter tutor” estão associadas de forma significativa e, por isso, não devem ser estudadas de forma independente. No presente estudo verifica-se este facto, uma vez que a população canina de clínica era constituída em maior quantidade por cães de raça pura e a população

canina de canil era predominantemente constituída por cães de raça indeterminada. Assim, o facto de a variável “raça” ter sido estudada independentemente da variável “clínica/canil”, pode também ter inviabilizado uma análise adequada.

4.4. Prevalência e consistência fecal

A alteração da consistência fecal foi associada de forma estatisticamente significativa com a infeção por *Giardia* spp. em cães de canil ($p=0,03$, $\chi^2=6,93$), tendo sido a maior prevalência detetada nas amostras de cães com fezes líquidas (100%), seguida das amostras de cães com fezes pastosas (68,8%), e por fim, uma prevalência de 30% em amostras de cães com fezes moldadas (Tabela 9). Foi, assim, encontrada uma prevalência sete vezes superior nos cães com diminuição da consistência fecal (OR=7, IC 95%: 1,29 – 37,91). Capelli et al. (2006), Leal (2015) e Scaramozzino et al. (2009) também detetaram uma associação estatisticamente significativa entre esta variável e a infeção por *Giardia* spp. em cães de canil.

Nos estudos de Epe et al. (2010), Neves et al. (2014) e Pipia et al. (2014) realizados na população canina de clínica, também os cães com diarreia revelaram um risco superior de infeção por *Giardia* spp. Neste estudo, apesar de os únicos cães de clínica positivos a *Giardia* spp. apresentarem fezes pastosas e líquidas, também com uma maior prevalência nas amostras dos cães com fezes líquidas (33,3%) seguida das fezes pastosas (14,3%), não foi encontrada qualquer associação estatisticamente significativa. O facto de o número de animais positivos ter sido muito reduzido nesta população canina (2/30) e a distribuição de amostras por cada tipo de fezes não ter sido equitativa, pode ter contribuído para este resultado.

Relativamente à infeção por *Cryptosporidium* spp., também alguns autores reportam uma prevalência significativamente superior em cães com diarreia (Mosallanejad et al., 2010; Olabanji et al., 2016). No presente estudo, a prevalência da infeção também foi superior nas amostras de cães com fezes líquidas, mas sem que tenha sido encontrada uma associação estatisticamente significativa (Tabela 10). Neste caso, apesar de o número de amostras estar distribuído de forma mais equitativa, o número de animais infetados também foi bastante reduzido (3/30), o que pode ter contribuído para este resultado.

Analisando os dados dos animais (Anexo IV), observou-se que maioria das amostras positivas a *Giardia* spp. nos cães adultos de canil apresentavam alteração da consistência fecal (9/11). Sendo a infeção por *Giardia* normalmente subclínica ou auto-limitante em cães adultos imunocompetentes, é provável que outros fatores tenham influenciado a consistência das fezes destes animais (CAPC, 2017; CFSPH, 2012). Um dos fatores possível é a coinfeção com outros parasitas, uma vez que também foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre a presença de outros endoparasitas e a alteração da consistência fecal (Tabela 11), o que está de acordo com os estudos de Neves et al. (2014), Paoletti et al. (2015) e Santos (2014). No entanto, uma vez que só dois destes animais apresentaram coinfeção,

outros fatores como a imunossupressão provocada pelo *stress*, os desequilíbrios nutricionais e outras doenças concomitantes frequentes num ambiente de canil, podem ter contribuído para a manifestação clínica da doença nos animais adultos (Mehlhorn, 2016b; Raza et al., 2018).

Como se pode observar, foi detetada a presença de quistos de *Giardia* nas amostras de cães de canil com fezes moldadas, o que reflete a presença de infeção subclínica, típica deste protozoário. Dada a dificuldade do diagnóstico deste parasita, a não realização de exames coprológicos de rotina por parte dos dois canis em estudo e a ineficácia dos desparasitantes utilizados, leva a que este parasita seja facilmente subdiagnosticado nestes animais com infeção subclínica. Embora estes animais tenham sido detetados numa prevalência mais baixa (30%), é ainda assim uma prevalência significativa, dada a sua capacidade de funcionarem como reservatório de *Giardia*, promovendo uma constante contaminação ambiental, persistência deste parasita e aumentando o risco de infeção e reinfeção (Raza et al., 2018; Scaramozzino et al., 2009). É possível, portanto, que estes sejam alguns dos fatores que tenham contribuído para a elevada prevalência de *Giardia* na população canina de canil estudada (60%).

O baixo número de amostras positivas a *Cryptosporidium* spp. pode ter influenciado negativamente as associações com os fatores de risco e consistência fecal. O facto de existirem poucos estudos a relacionar estas variáveis com a infeção por *Cryptosporidium* spp. também dificulta o estabelecimento destas associações.

4.5. População parasitária

A prevalência global de endoparasitas obtida neste estudo foi de 40% (24/60), o que se aproxima da prevalência de 39,2% encontrada no distrito de Évora (Ferreira et al., 2011) e de 44% no distrito de Bragança (Leal, 2015), também na população canina de clínica e canil.

Dos vários grupos parasitários observados, o mais predominante foi o dos protozoários com uma prevalência de 33,3% (20/60), seguido dos nemátodes com uma prevalência de 10% (6/60). Entre os protozoários, *Giardia* spp. foi o mais prevalente na população estudada (100%, 20/20), sendo a maioria dos animais infetados provenientes de canil (18/20). Também no estudo de Ferreira et al. (2011), *Giardia* spp. foi o parasita mais prevalente, com a maioria dos animais infetados provenientes da população canina de canil. No estudo de Braga (2017) e Santos (2014), *Giardia* spp. foi a espécie parasitária intestinal com maior prevalência em cães de canil do distrito de Beja e do concelho de Vila Franca de Xira, respetivamente. Eduardo (2008) revelou no seu estudo que os protozoários foram os parasitas mais prevalentes na população canina de canil da região do norte de Portugal, tendo sido *Giardia* spp. o parasita que apresentou prevalências mais elevadas.

A maior prevalência de protozoários relativamente aos nemátodes, também confirma os resultados obtidos em vários estudos de outros países, nos quais *Giardia* spp. foi o parasita mais assinalado em várias populações caninas, mas particularmente em ambiente de canil (Huber et al., 2005; Ortuño & Castellà, 2011; Ortuño et al., 2014; Paoletti et al., 2015; Papazahariadou et al., 2007; Papini et al., 2005; Sommer et al., 2018).

De facto, nas últimas décadas, o grupo dos protozoários tem assumido uma maior importância e prevalência comparativamente aos helmintes, o que pode resultar de um fenómeno emergente natural ou ser devido a uma melhoria significativa dos testes de diagnóstico (Villeneuve, 2009, citado por Neves et al., 2014). A prevalência de helmintes tem vindo a decrescer, também devido à crescente consciencialização dos tutores e a uma maior frequência de administração de anti-helmínticos. A resistência dos protozoários aos anti-helmínticos promove a colonização do nicho libertado pela eliminação dos helmintes e, consequentemente, uma maior prevalência deste grupo parasitário (Bugg et al., 1999).

A maior prevalência de endoparasitas nos cães de canil (60%), comparativamente aos cães de clínica (20%), está de acordo com o expectável, uma vez que todas as condições, anteriormente descritas, presentes no ambiente de canil, promovem a maior transmissão e dispersão dos parasitas. Tendo todos os parasitas encontrados um ciclo de vida direto, maior é a facilidade de transmissão entre hospedeiros definitivos, dada a sobredensidade populacional existente e dado não ser necessário um hospedeiro intermediário para completar o ciclo de vida (Raza et al., 2018).

Apesar da prevalência de endoparasitas ser inferior nos cães de clínica, o que está de acordo com as condições de menor densidade animal, melhores condições de higiene, menos fatores de stress e melhores cuidados de saúde, a prevalência de nemátodes nesta população canina (16,7%) foi superior à dos cães de canil (3,3%). Isto sugere, possivelmente, uma ausência ou insuficiente administração de anti-helmínticos pelos tutores destes animais de companhia. Esta situação foi reportada em dois estudos recentes realizados no concelho de Sintra e de Vila Franca de Xira, onde apenas 53,8% (Diniz, 2018) e 51,4% (Morgado, 2016) dos tutores, respetivamente, cumpriram o protocolo de desparasitação interna de quatro desparasitações anuais recomendado pelo médico veterinário e considerado pela *European Scientific Counsel Companion Animal Parasites* (ESCCAP) como o limiar mínimo de eficácia na prevenção de endoparasitoses. Assim, teria sido interessante estudar os hábitos de desparasitação na população canina de clínica. Outros fatores desconhecidos neste estudo e que poderão também ter influenciado esta prevalência são as condições de acesso ao exterior e o tipo de atividade dos animais (Paoletti et al., 2015).

No presente estudo, nenhuma amostra foi positiva a céstodes. Resultados falsos-negativos devem ser considerados pois, apesar da técnica de flutuação após centrifugação (utilizada neste estudo) ser mais eficaz na deteção da maioria dos parasitas, quando comparada com a flutuação passiva ou o método de sedimentação, no caso dos céstodes não é a mais

apropriada. Assim, esta técnica deve ser utilizada em associação com o método de sedimentação para aumentar a sensibilidade na deteção de céstodes, pois permite a deteção dos ovos destes parasitas que são mais densos e que por gravidade se depositam no fundo do recipiente (Dryden et al., 2006; Oliveira-Sequeira et al., 2002).

4.6. Associações parasitárias

A maioria das amostras positivas a endoparasitas, correspondem a infeções parasitárias simples (com um só género) (28,3%) e apenas 11,7% correspondem a infeções mistas com dois géneros de parasitas. Também nos estudos de Ferreira et al. (2011), Leal (2015), Lebre (2011) e Neves et al. (2014), se verificou esta tendência. Já no estudo de Santos (2014), verificou-se o inverso, ou seja, uma maior prevalência de infeções com dois géneros de parasitas relativamente às infeções simples. Os resultados do presente estudo estão também de acordo com estudos realizados em outros países, nos quais as infeções simples são mais comuns do que as infeções mistas (Bajer et al., 2011; Gracenea et al., 2009; Paoletti et al., 2015; Papazahariadou et al., 2007; Sommer et al., 2018).

A coinfeção mais frequente foi a de *Giardia* spp. com *Cryptosporidium* spp. (5%), de seguida *Giardia* spp. e *Cystoisospora* spp. (3,3%), *Giardia* spp. e Ancylostomatidae (1,7%) e por fim, *Giardia* spp. e *Toxocara canis* (1,7%). Como verificado neste estudo, a maioria das associações entre os vários parasitas foram tão mais frequentes quanto maiores as prevalências individuais de cada parasita, o que também se observou em outros estudos realizados tanto em Portugal como em Espanha (Ferreira, 2015; Ferreira et al., 2011; Leal, 2015; Ortuño & Castellà, 2011; Santos, 2014). No entanto a coinfeção de *Giardia* spp. e Ancylostomatidae não seguiu esta tendência, o que se pode dever ao facto de os ancilostomídeos só estarem presentes na população canina de clínica, na qual, por sua vez, o número de amostras positivas a *Giardia* spp. é muito reduzido (2/30), diminuindo a prevalência desta coinfeção. O estudo de Oliveira-Sequeira et al. (2002) demonstrou uma maior prevalência da associação de *Giardia* spp. com *Cystoisospora* spp. do que com outros parasitas, mesmo sendo a prevalência de *Cystoisospora* spp. mais baixa do que a dos outros parasitas, o que sugere que as associações parasitárias não dependem apenas das prevalências individuais de cada parasita.

Para além da coinfeção com *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. ser a mais frequente, observou-se uma associação positiva estatisticamente significativa entre estes dois protozoários ($p=0,01$, $\chi^2=6,32$), uma vez que todos os animais positivos a *Cryptosporidium* spp. foram também positivos a *Giardia* spp. Esta associação pode dever-se à semelhante epidemiologia destes dois parasitas (Hamnes et al., 2007). Foi também estudada a associação entre a presença de protozoários e a presença de nemátodes, não tendo sido encontrada uma associação estatisticamente significativa.

Vários estudos encontraram associações estatisticamente significativas entre estes parasitas. Huber et al. (2005) e Sommer et al. (2018) encontraram uma associação positiva estatisticamente significativa entre a presença de protozoários e a presença de nemátodes, pondo em causa a teoria de competição avançada por Bugg et al. (1999); no entanto, no caso de Sommer et al. (2018), mesmo com prevalências de nemátodes baixas, esta associação deveu-se provavelmente à população canina estudada ser maioritariamente constituída por animais jovens, que tendem a estar mais frequentemente infetados com outros endoparasitas relativamente aos cães adultos. Já outro autor (Bajer et al., 2011) encontrou uma associação negativa com uma prevalência significativamente superior de protozoários intestinais nos animais que não apresentavam infeção por nemátodes, o que sugere a presença de competição parasitária (Bugg et al., 1999) e, tal como no presente estudo, encontrou uma associação positiva estatisticamente significativa entre *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. Um outro estudo realizado em cães durante o seu primeiro ano de vida (Hamnes et al., 2007), também foi ao encontro do nosso resultado uma vez que obteve uma associação positiva estatisticamente significativa entre *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp.; no mesmo estudo também foi encontrada uma prevalência significativamente superior de helmintes nos cães que estavam infetados simultaneamente com *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., tendo sido sugerido como causa um ambiente muito contaminado e uma maior suscetibilidade destes animais às infeções parasitárias.

Assim, vários tipos de associações parasitárias podem estar presentes na mesma amostra populacional dependendo não só da prevalência individual de cada parasita, mas também de vários fatores como anteriormente mencionado.

4.7. Potencial zoonótico

A infeção por *Giardia* spp. no cão está principalmente associada aos *assemblages* caninos C e D, e ocasionalmente, aos *assemblages* A e B que são, por sua vez, os mais frequentes nos humanos, havendo assim um potencial zoonótico. A infeção por *Cryptosporidium* spp. no cão é normalmente causada pela espécie *C. canis* e nos humanos por *C. hominis* e *C. parvum*. Apesar de já terem sido reportados casos de infeção nos humanos com os *assemblages* caninos de *Giardia* spp. e com *C. canis*, ou infeções por *C. canis* ou pelos vários *assemblages* de *Giardia* spp. tanto em cães como nos humanos que contactam com estes animais, foi encontrada uma evidência nula ou limitada da transmissão zoonótica na maioria dos estudos realizados a nível comunitário. Assim, as infeções por *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. são consideradas zoonoses raras em circunstâncias económicas, sanitárias e de saúde normais, apesar do estreito contacto entre os animais de companhia e os humanos. No entanto, apesar do risco zoonótico ser considerado mínimo a nulo para a saúde pública da população geral, comparativamente a outros fatores de risco, este não pode ser descartado, principalmente para os indivíduos imunodeprimidos (Bowman & Lucio-Forster, 2010; de Lucio

et al., 2017; Overgaauw et al., 2009). Relativamente à distribuição dos *assemblages* de *Giardia* spp. nas diferentes populações caninas, em alguns estudos os *assemblages* caninos C e D predominaram nos cães de canil e os *assemblages* A e B nos cães de ambiente doméstico, com os tutores expostos a um maior risco zoonótico; já em outros estudos verificou-se o oposto. Uma vez que não foram obtidos resultados consistentes entre os vários estudos, seria importante a realização de mais estudos nestas populações caninas para uma melhor compreensão do risco que estes animais de companhia representam para os humanos (Claerebout et al., 2009).

Relativamente à amostra populacional em estudo, não é possível aferir o verdadeiro risco de transmissão zoonótica, tanto de *Giardia* spp. como de *Cryptosporidium* spp., uma vez que apenas foi possível realizar a genotipagem molecular de metade das amostras positivas a *Giardia* spp. (10/20) e não foi realizada a genotipagem de nenhuma das amostras positivas a *Cryptosporidium* spp. Das 10 amostras positivas a *Giardia* spp. através da IFD e da técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco e que foram genotipadas, apenas em 4 se obteve um resultado positivo, o que mostra a reduzida sensibilidade da técnica de PCR relativamente às duas técnicas realizadas neste estudo. Das 4 amostras positivas, 2 eram provenientes do canil de Lisboa e as outras 2 do canil de Cascais. Das amostras provenientes do canil de Lisboa, uma revelou ter o genótipo C e a outra o genótipo D. Relativamente às 2 amostras provenientes do canil de Cascais, ambas revelaram ter o genótipo D.

Relativamente ao risco zoonótico de *Cryptosporidium* spp., este é provavelmente muito reduzido para a população geral, desde que em indivíduos imunocompetentes, devido à baixa prevalência obtida na amostra populacional estudada e tendo em conta o explicado anteriormente. Em relação a *Giardia* spp., o risco zoonótico é teoricamente superior, devido à elevada prevalência encontrada neste estudo, principalmente em ambiente de canil, sendo maior o risco para a equipa técnica que está sujeita a uma maior exposição diária, mas também para os futuros tutores que adotem estes animais. O facto de se ter detetado apenas *assemblages* caninos nas amostras de cães de canil analisadas, sugere que estes animais representam um risco zoonótico mínimo. No entanto, não podemos extrapolar estes resultados para o resto da amostra populacional nem podemos descartar a hipótese da presença dos *assemblages* A e B nas amostras que foram negativas através da técnica de PCR.

Para aferir o potencial risco zoonótico nos cães de clínica, devemos ter em conta a maior prevalência de nemátodes em cães de clínica obtida no nosso estudo e os resultados, já referidos, dos inquéritos dos estudos de Diniz (2018) e Morgado (2016), que revelaram que apenas cerca de metade dos tutores cumpriam o protocolo de desparasitação interna recomendada pela ESCCAP e nos agregados familiares com indivíduos imunodeprimidos, apenas 16,3% o cumpriam. Para além disso, Morgado (2016) também documentou a presença de comportamentos de potencial risco zoonótico na população canina, como o

picacismo (27,5%), ingestão de fezes (17,5%), o ato de lambar a cara do tutor (83,3%) e dormir com o tutor (42,3%). Estes dados sugerem que muitos dos tutores não têm ainda o conhecimento suficiente sobre a importância da profilaxia medicamentosa, boas práticas de higiene e cuidados básicos na prevenção das doenças parasitárias. Apesar do risco zoonótico de *Giardia* spp. provavelmente ser mínimo para os tutores imunocompetentes, dada a baixa prevalência obtida nos cães de clínica e o explicado anteriormente, este tipo de comportamentos por parte dos tutores coloca a população de indivíduos imunodeprimidos em maior risco. Assim, a instrução dos tutores por parte dos médicos-veterinários para o potencial zoonótico e para a adoção de medidas higiénicas adequadas deve ser reforçada e ser parte integrante das consultas de medicina preventiva.

5. Conclusão

Após análise e discussão dos resultados, conclui-se que as prevalências globais de 33,3% para *Giardia* spp. e de 5% para *Cryptosporidium* spp. estão de acordo com vários estudos realizados em Portugal e em outros países europeus. Também a maior prevalência destes protozoários, principalmente de *Giardia* spp., em ambiente de canil, e a sua maior prevalência em relação aos outros endoparasitas seguiu a tendência da maioria dos estudos.

A coinfeção por *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp. foi a mais frequente, tendo sido a associação entre estes protozoários estatisticamente significativa, o que se deve provavelmente à sua semelhante epidemiologia.

Na população canina estudada, a origem quer de canil, quer do CRO de Lisboa foram considerados fatores de risco para a infeção por *Giardia* spp., com uma probabilidade de infeção cerca de vinte e doze vezes superior, respetivamente. Também o risco de infeção por *Giardia* spp. revelou ser sete vezes superior nos cães com diminuição da consistência fecal, apenas nos cães de canil. A determinação de fatores de risco para *Cryptosporidium* spp. não foi possível, muito provavelmente devido ao reduzido número de animais positivos.

Em relação aos métodos de diagnóstico, a técnica de imunofluorescência direta foi a técnica que detetou um maior número de animais positivos, considerando-se assim, uma técnica com uma elevada sensibilidade (tendo também em conta a elevada sensibilidade indicada pelo fabricante). No entanto, a técnica de flutuação após centrifugação com sulfato de zinco e a coloração de Ziehl-Neelsen revelaram ser as técnicas com o maior custo-benefício para a deteção de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., respetivamente, uma vez que apresentaram uma boa concordância estatística com a técnica de referência (IFD), permitiram o diagnóstico de outros endoparasitas e foram as mais económicas. Assim sendo, estas são as técnicas que mais se adequam para o diagnóstico nos canis, pois para além do fator económico ter um grande peso nestas instituições, sabendo quais os endoparasitas presentes, vai permitir a escolha do plano de higienização, desinfecção e desparasitação adequados. Estas

informações são úteis para a definição de estratégias de controlo integradas contra as infeções parasitárias.

Já para o diagnóstico em cães de clínica, as técnicas de microscopia convencional nem sempre são aplicáveis na prática e a técnica de IFD, apesar de eficaz, rápida, de fácil execução e interpretação, é muito dispendiosa. Nestes casos, uma técnica alternativa mais prática, mais viável economicamente e também com uma elevada performance (segundo a bibliografia), apesar de não ter sido incluída neste estudo, é a imunocromatografia.

Dada a elevada prevalência dos dois protozoários em estudo, particularmente de *Giardia* spp., obtida nos cães de canil, estes animais representam uma fonte importante de contaminação ambiental e de transmissão para outros animais antes e depois da adoção, e representam um maior risco de transmissão zoonótica. Assim, uma maior prevenção e controlo destas parasitoses impõe-se nestas instituições. Tendo ainda em consideração a prevalência significativa de animais com infeção subclínica e o facto de a profilaxia e tratamento médico serem pouco eficazes e/ou dispendiosos, torna-se muito difícil a eliminação destes parasitas no ambiente de canil com vários fatores propícios à manutenção e dispersão parasitária, sublinhando a importância de uma estratégia de controlo integrada com a realização regular de exames coprológicos para a pesquisa de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., vigilância do estado geral dos animais, exames clínicos regulares, redução dos fatores de stress e adoção de medidas de higiene e desinfeção adequadas a estes parasitas. Uma vez que os animais de canil foram errantes durante algum tempo e possivelmente uma percentagem destas infeções teve origem antes do momento de captura, considera-se a possibilidade de estes representarem uma fonte de contaminação significativa para os espaços públicos, promovendo uma maior exposição dos grupos de risco (crianças, grávidas, idosos e imunodeprimidos).

Apesar da baixa prevalência de *Giardia* spp. em cães de clínica, estes animais não deixam também de representar uma fonte de contaminação ambiental e um potencial risco zoonótico, ainda que mínimo. Uma vez que o diagnóstico e o tratamento em cães sem sinais clínicos de ambiente doméstico não são recomendados, a prevenção assume um papel fulcral e determinante no controlo desta infeção.

Relativamente ao risco zoonótico de *Cryptosporidium* spp., este parece ser reduzido, dada a baixa prevalência obtida na amostra populacional estudada. Em relação a *Giardia* spp., existe um maior risco zoonótico para a equipa técnica do canil, uma vez que estão expostos diariamente a uma população de animais com uma elevada prevalência de infeção por este parasita.

A prevalência global de endoparasitas foi inferior nos cães de clínica relativamente aos de canil; no entanto a prevalência de nemátodes foi superior, o que sugere uma insuficiente administração de anti-helmínticos pelos tutores destes animais de companhia.

Tendo em conta este panorama geral, reforça-se a importância do papel dos médicos-veterinários para a sensibilização da população acerca da importância do cumprimento do plano de desparasitação interna recomendado, para a prevenção da maioria das endoparasitoses, e da adoção de boas práticas de higiene, principalmente para a prevenção de doenças com potencial zoonótico como *Giardia* e *Cryptosporidium* que carecem de outros meios de prevenção.

6. Recomendações e perspetivas futuras

Futuramente, seria importante a realização de mais estudos em Portugal à semelhança de estudos realizados em outros países, onde fossem avaliados nas várias populações caninas os fatores de risco aqui estudados, alguns dos quais não revelaram uma associação estatisticamente significativa neste estudo, pelo reduzido número de animais positivos (no caso de *Cryptosporidium* spp.), e outros fatores de risco não tão estudados, que não foi possível incluir neste estudo por questões logísticas e de gestão de tempo, como: condições de acesso ao exterior, tipo de atividade dos animais, proveniência dos animais (criador/canil/rua/abrigo), frequência de desparasitação, condição clínica, o número de cães em casa, a presença de infeção por helmintes, o número de animais por *box*, o número de cães do canil, o tempo de permanência no canil, o tipo de pavimento do canil e o material das *boxes*.

Seria também importante, a realização de mais estudos longitudinais conduzidos a nível comunitário, nos quais se realizasse a genotipagem molecular de todas as amostras positivas a estes parasitas, de cães e pessoas no mesmo espaço temporal e espacial.

Este tipo de estudos permitiria uma melhor compreensão da epidemiologia e do verdadeiro risco zoonótico destes dois parasitas.

Bibliografia

- Adam, R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 447–475.
- Akiyoshi, D. E., Dilo, J., Pearson, C., Chapman, S., Tumwine, J., & Tzipori, S. (2003). Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species. *Infection and Immunity*, 71(4), 1828–1832. <https://doi.org/10.1128/iai.71.4.1828-1832.2003>
- Aldeyarbi, H. M., & Karanis, P. (2016). The fine structure of sexual stage development and sporogony of *Cryptosporidium parvum* in cell-free culture. *Parasitology*, 143(06), 749–761.
- Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K. & Svärd, S. G. (2010). Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 413–422. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2317>
- Bajer, A., Bednarska, M., & Rodo, A. (2011). Risk factors and control of intestinal parasite infections in sled dogs in Poland. *Veterinary Parasitology*, 175(3–4), 343–350. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2010.10.029>
- Ballweber, L. R., Xiao, L., Bowman, D. D., Kahn, G. & Cama, V. A. (2010). Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends in Parasitology*, 26(4), 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.02.005>
- Batchelor, D. J., Tzannes, S., Graham, P. A., Wastling, J. M., Pinchbeck, G. L., & German, A. J. (2008). Detection of Endoparasites with Zoonotic Potential in Dogs with Gastrointestinal Disease in the UK. *Transboundary and Emerging Diseases*, 55(2), 99–104. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2007.01005.x>
- Becker, A.-C., Rohen, M., Epe, C., & Schnieder, T. (2012). Prevalence of endoparasites in stray and fostered dogs and cats in Northern Germany. *Parasitology Research*, 111(2), 849–857. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2909-7>
- Beelitz, P., Leonhard, S., & Pfister, K. (2006). *Giardia*: infections in dogs in Germany: evaluation of treatment regimes carried out in different types of pet keeping and prevalence. *Praktische Tierarzt*, 87, 597–+.
- Bernander, R., Palm, J. E., & Svärd, S. G. (2001). Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cellular Microbiology*, 3(1), 55–62.
- Bouزيد, M., Halai, K., Jeffreys, D. & Hunter, P. R. (2015). The prevalence of *Giardia* infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. *Veterinary Parasitology*, 207(3–4), 181–202. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.011>
- Bowman, D. D. (2014). Protista. In D.D. Bowman (Ed.), *Georgis' parasitology for veterinarians* (10th ed., pp. 92–98). St. Louis, Missouri: WB Saunders Co.
- Bowman, D. D., Liotta, J. L., Ulrich, M., Charles, S. D., Heine, J., & Schaper, R. (2009). Treatment of naturally occurring, asymptomatic *Giardia* sp. in dogs with drontal® plus flavour tablets. *Parasitology Research*, 105(S1), 125–134. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1503-0>

- Bowman, D. D. & Lucio-Forster, A. (2010). Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: veterinary and public health importance. *Experimental Parasitology*, 124(1), 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.01.003>
- Braga, M. I. F. L. (2017). *Prevalência e sazonalidade de parasitoses gastrointestinais, cardiovasculares e hemáticas em cães do distrito de beja, Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.
- Buchel, L. A., Gorenflot, A., Chochillon, C., Savel, J., & Gobert, J. G. (1987). In vitro excystation of *Giardia* from humans: a scanning electron microscopy study. *The Journal of Parasitology*, 73(3), 487–493.
- Bugg, R. J., Robertson, I. D., Elliot, A. D., & Thompson, R. C. A. (1999). Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. *The Veterinary Journal*, 157(3), 295–301. <https://doi.org/10.1053/TVJL.1998.0327>
- Buret, G. (2008). Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. *Parasite (Paris, France)*, 15(3), 261–265. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153261>
- Cacciò, S. M., Lalle, M. & Svärd, S. G. (2017). Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. *Infection, Genetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.12.001>
- Cacciò, S. M., & Putignani, L. (2014). Epidemiology of human cryptosporidiosis. In S.M. Cacciò & G. Widmer (Eds.), *Cryptosporidium: parasite and disease*. Viena: Springer. Acedido em Mai. 20, 2018, disponível em https://books.google.pt/books?id=wl26BAAQBAJ&dq=Cryptosporidium+life+cycle&hl=pt-PT&source=gbs_navlinks_s
- Cacciò, S. M., Thompson, R. C. A., McLauchlin, J., & Smith, H. V. (2005). Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology*, 21(9), 430–437. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.06.013>
- Capelli, G., Regalbono, A. F., Iorio, R., Pietrobelli, M., Paoletti, B., & Giangaspero, A. (2006). *Giardia* species and other intestinal parasites in dogs in north-east and central Italy. *Veterinary Record*, 159(13), 422–424. <https://doi.org/10.1136/VR.159.13.422>
- Carranza, P. G., & Lujan, H. D. (2010). New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes and Infection*, 12(1), 71–80.
- Cavalier-Smith, T. (2014). Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *European Journal of Protistology*, 50(5), 472–495.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2015). *Giardia: sources of infection & risk factors*. Acedido em Jun. 7, 2018, disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/Giardia/infection-sources.html>
- Certad, G., Viscogliosi, E., Chabé, M., & Cacciò, S. M. (2017). Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends in Parasitology*, 33(7), 561–576. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.02.006>
- Chai, J. Y., Shin, S. M., Yun, C. K., Yu, J. R., & Lee, S. H. (1990). Experimental activation of cryptosporidiosis in mice by immunosuppression. *The Korean Journal of Parasitology*, 28(1), 31. <https://doi.org/10.3347/kjp.1990.28.1.31>

- Chako, C. Z., Tyler, J. W., Schultz, L. G., Chiguma, L., & Beerntsen, B. T. (2010). Cryptosporidiosis in people: it's not just about the cows. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 37–43.
- Chalmers, R. M., Campbell, B. M., Crouch, N., Charlett, A., & Davies, A. P. (2011). Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the UK. *Journal of Medical Microbiology*, 60(11), 1598–1604. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.034181-0>
- Chalmers, R. M. & Katzer, F. (2013). Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends in Parasitology*, 29(5), 237–251. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2013.03.001>
- Claerebout, E. (2018). Treatment of *Giardia* infections in dogs. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 87(2), 57. Acedido em Mar. 17, 2019, disponível em: <https://biblio.ugent.be/publication/8604901>
- Claerebout, E., Casaert, S., Dalemans, A. C., De Wilde, N., Levecke, B., Vercruysse, J., & Geurden, T. (2009). *Giardia* and other intestinal parasites in different dog populations in Northern Belgium. *Veterinary Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.11.024>
- Coelho, C. H., Silva, A. C. C., Costa, A. O., & Fernandes, A. P. (2017). Morphological and physiological characteristics of a virulent and zoonotic assemblage A *Giardia duodenalis* canine strain. *Acta Tropica*, 174(July), 76–81.
- Coklin, T., Farber, J. M., Parrington, L. J., Kingombe, C. I. Bin, Ross, W. H., & Dixon, B. R. (2011). Immunomagnetic separation significantly improves the sensitivity of polymerase chain reaction in detecting *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(2), 260–267. <https://doi.org/10.1177/104063871102300210>
- Companion Animal Parasite Council. (2017). *CAPC guidelines: Cryptosporidium*. Acedido em Mai. 25, 2018, disponível em: <https://www.capcvet.org/guidelines/Cryptosporidium/>
- Companion Animal Parasite Council. (2018). *CAPC guidelines: Giardia*. Acedido em Mai. 25, 2018, disponível em: <https://www.capcvet.org/guidelines/Giardia/>
- Datz, C., & Harter, M. (2014). Recurrent *Giardia* infection in a dog. *Clinician's Brief*. Acedido em Mar. 18, 2019, disponível em: <https://files.brief.vet/migration/article/17956/recurrent-Giardia-infection-17956-article.pdf>
- Decock, C., Cadiergues, M. C., Larcher, M., Vermot, S., & Franc, M. (2003). Comparison of two techniques for diagnosis of giardiasis in dogs. *Parasite*, 10(1), 69–72. <https://doi.org/10.1051/parasite/2003101p69>
- de Lucio, A., Bailo, B., Aguilera, M., Cardona, G. A., Fernandez-Crespo, J. C. & Carmena, D. (2017). No molecular epidemiological evidence supporting household transmission of zoonotic *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from pet dogs and cats in the province of Alava, Northern Spain. *Acta Tropica*, 170, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.024>
- Diniz, T. P. (2018). *Prevalência de parasitas gastrointestinais e frequência de desparasitação em cães e gatos no concelho de Sintra, Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.

- Dryden, M. W., Payne, P. a, & Smith, V. (2006). Accurate diagnosis of *Giardia* spp. and proper fecal examination procedures. *Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine*, 7(1), 4–14.
- Dubná, S., Langrová, I., Nápravník, J., Jankovská, I., Vadlejch, J., Pekár, S., & Fechtner, J. (2007). The prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 145(1–2), 120–128. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2006.11.006>
- Ehsan, M. A., Akter, M., Ahammed, M., Ali, M. A., Ahmed, M. U., Leveck, B., & Claerebout, E. (2017). Prevalence and clinical importance of *Cryptosporidium* and *Giardia* in human and animals. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 14(2), 109. <https://doi.org/10.3329/bjvm.v14i2.31376>
- Einarsson, E., Ma'ayeh, S., & Svärd, S. G. (2016). An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.019>
- Epe, C., Rehker, G., Schnieder, T., Lorentzen, L., & Kreienbrock, L. (2010). *Giardia* in symptomatic dogs and cats in Europe - results of a European study. *Veterinary Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.015>
- Erlandsen, S. L., Macechko, P. T., Keulen, H. Van, & Jarroll, E. L. (1996). Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43(5), 416–430.
- Erlandsen, S. L., Russo, A. P., & Turner, J. N. (2004). Evidence for adhesive activity of the ventrolateral flange in *Giardia lamblia*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51(1), 73–80.
- European Scientific Counsel Companion Animal Parasites. (2018). *Control of intestinal protozoa in dogs and cats*. Worcestershire, UK: ESCCAP.
- Fayer, R. (2007). General biology. In R. Fayer & L. Xiao (Eds.), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis* (2nd ed.). (pp. 1–35). Boca Raton: CRC Press. Acedido em Abr. 6, 2018, disponível em https://books.google.pt/books?id=suJZXO2_gK0C&pg=PA2&dq=Cryptosporidium+history&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwj3tT2m6baAhUDlxQKHd6aA-gQ6AEILzAB#v=onepage&q=Cryptosporidium+history&f=false
- Fayer, R. (2010). Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, 124(1), 90–97.
- Fernandes, Â. D. P. (2012). *Parasitismo por Giardia spp. em canis de criação na região de Viseu, Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.
- Ferreira, A. M. N. (2015). *Gastrointestinal parasite risk in dog parks in the Lisbon area*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.
- Ferreira, F. S., Pereira-Baltasar, P., Parreira, R., Padre, L., Vilhena, M., Távora T. L., Centeno-Lima, S. (2011). Intestinal parasites in dogs and cats from the district of Évora, Portugal. *Veterinary Parasitology*, 179(1–3), 242–245. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.02.003>

- Fink, M. Y., & Singer, S. M. (2017). The intersection of immune responses, microbiota, and pathogenesis in giardiasis. *Trends in Parasitology*, 33(11), 901–913. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.08.001>
- Ford, B. J. (2005). The Discovery of *Giardia*. *Microscope*, 53(4). Acedido em Abr. 4, 2018, disponível em <http://www.brianjford.com/Giardia-14-06.pdf>
- Galindo, J. F. G., Romero, A. O., Espuny, J. C. & de Merced, S. A. (2006). Métodos coprológicos utilizados en el diagnóstico de enfermedades parasitarias. In *Parasitología Clínica: Parasitosis digestivas del perro y del gato* (pp. 134-5). Barcelona: Multimédica Ediciones Veterinarias.
- Gates, M. C., & Nolan, T. J. (2009). Endoparasite prevalence and recurrence across different age groups of dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, 166(1–2), 153–158. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2009.07.041>
- Geurden, T., Berkvens, D., Casaert, S., Vercruysse, J., & Claerebout, E. (2008). A bayesian evaluation of three diagnostic assays for the detection of *Giardia duodenalis* in symptomatic and asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, 157(1–2), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.002>
- Gotfred-Rasmussen, H., Lund, M., Enemark, H. L., Erlandsen, M. & Petersen, E. (2016). Comparison of sensitivity and specificity of 4 methods for detection of *Giardia duodenalis* in feces: immunofluorescence and PCR are superior to microscopy of concentrated iodine-stained samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 84(3), 187–190. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.11.005>
- Gracenea, M., Gómez, M., & Torres, J. (2009). Prevalence of intestinal parasites in shelter dogs and cats in the metropolitan area of Barcelona (Spain). <https://doi.org/10.2478/s11686-009-0005-7>
- Griffiths, J. K. (1998). Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment, and diagnosis. In J.R. Baker, R. Muller, D. Rollinson, & S. Tzipori (Eds.), *Opportunistic protozoa in humans* (pp. 70–71). London, UK: Academic Press. Acedido em Jan. 16, 2019, disponível em https://books.google.pt/books?id=X8x7eU07M5QC&lr=&hl=pt-PT&source=gbs_navlinks_s
- Hamnes, I. S., Gjerde, B. K., & Robertson, L. J. (2007). A longitudinal study on the occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in dogs during their first year of life. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-49-22>
- Hanson, K. L., & Cartwright, C. P. (2001). Use of an enzyme immunoassay does not eliminate the need to analyze multiple stool specimens for sensitive detection of *Giardia lamblia*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 474–477. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.474-477.2001>
- Harrington, B. J. (2008). Microscopy of 4 pathogenic enteric protozoan parasites : a review, 39(4), 231–238. <https://doi.org/10.1309/83G3PE2H1V2NY9FK>
- Hetsko, M. L., McCaffery, J. M., Svärd, S. G., Meng, T.-C., Que, X., & Gillin, F. D. (1998). Cellular and transcriptional changes during excystation of *Giardia lamblia* in vitro. *Experimental Parasitology*, 88(3), 172–183.
- Hijjawi, N. S., Meloni, B. P., Ng'anzo, M., Ryan, U. M., Olson, M. E., Cox, P. T., Monis, P.T., Thompson, R. C. A. (2004). Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *International Journal for Parasitology*, 34(7), 769–777.

- Houe, H., Ersbøll, A. K., Toft, N. & Kongelige Veterinær- og landbohøjskole. (2004). *Introduction to veterinary epidemiology*. Denmark: Biofolia.
- House, S. A., Richter, D. J., Pham, J. K., & Dawson, S. C. (2011). *Giardia* flagellar motility is not directly required to maintain attachment to surfaces. *PLoS Pathogens*, 7(8), e1002167.
- Huber, F., Bomfim, T. C. B., & Gomes, R. S. (2005). Comparison between natural infection by *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp. in dogs in two living situations in the West Zone of the municipality of Rio de Janeiro. *Veterinary Parasitology*, 130(1–2), 69–72. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2005.03.012>
- Jakubowski & J. Hoff (Eds.), *Waterborne transmission of Giardiasis: proceedings of a symposium* (pp.2–3). US: Environmental Protection Agency. Acedido em Abr. 4, 2018, disponível em <https://books.google.pt/books?id=ciEoaOcf0mwC&pg=PA2&lpg=PA2&dq=grassi+dimor&hl=pt-PT#v=onepage&q=classification&f=false>
- Júlio, C., Vilares, A., Oleastro, M., Ferreira, I., Gomes, S., Monteiro, L., Ângelo, H. (2012). Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: a case study in Portugal. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-22>
- Khan, A., Shaik, J. S., & Grigg, M. E. (2017). Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta Tropica*, 184(July 2017), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.023>
- Koehler, A. V., Jex, A. R., Haydon, S. R., Stevens, M. A., & Gasser, R. B. (2014). *Giardia*/giardiasis - A perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnology Advances*, 32(2), 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.009>
- Koh, W., Thompson, A., Edwards, H., Monis, P., & Clode, P. L. (2014). Extracellular excystation and development of *Cryptosporidium*: tracing the fate of oocysts within *Pseudomonas* aquatic biofilm systems. *BMC Microbiology*, 14(1), 281.
- Lappin, M. R. (2011). How I treat *Giardia* infections. In *World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings*. Fort Collins. Acedido em Mar. 20, 2019, disponível em: <https://www.vin.com/doc/?id=6698876>
- Lauwaet, T., Davids, B. J., Reiner, D. S., & Gillin, F. D. (2007). Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. *Current Opinion in Microbiology*, 10(6), 554–559.
- Leal, S. M. F. (2015). *Prevalência de Cryptosporidium spp. e de Giardia spp. em cães do distrito de Bragança, Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.
- Lebre, F. L. (2011). *Rastreio de parasitas gastrintestinais e seu impacto zoonótico em cães de canil da cidade de Lisboa*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.
- Levine, N. D. (1979). *Giardia lamblia*: classification, structure, identification. In W.
- Logsdon, J. M. (2008). Evolutionary Genetics: Sex Happens in *Giardia*. *Current Biology*, 18(2), R66–R68.
- Maia, C., Nogueira, J., Mendão, C., & Cardoso, L. (2013). Giardiose canina em Portugal – prevalência de infecção por *Giardia duodenalis* em cachorros com alterações gastrointestinais. *Veterinary Medicine*, 15(90), 49–53.

- Manser, M., Granlund, M., Edwards, H., Saez, A., Petersen, E., Evengard, B., & Chiodini, P. (2014). Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in clinical laboratories in Europe - a comparative study. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(1), O65–O71. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12297>
- Martins, S., Sousa, S., Madeira de Carvalho, L.M., Bacelar, J., Cannas da Silva, J. (2007). Prevalence of *Cryptosporidium parvum* Infection in Northwest Portugal Dairy Calves and Efficacy of Halofuginone Lactate on the Prevention of Cryptosporidiosis. *Cattle Practice*, 15, Part 2, 152-156
- Matos, O., Tomás, A., Aguiar, P., Casemore, D., & Antunes, F. (1998). Prevalence of cryptosporidiosis in AIDS patients with diarrhoea in Santa Maria Hospital, Lisbon.
- Mehlhorn, H. (2016a). Diplomonadida. In *Encyclopedia of Parasitology* (pp. 718–719). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Mehlhorn, H. (2016b). *Encyclopedia of parasitology* (4th ed.). Berlin: Springer.
- Mehlhorn, H. (2016c). Mastigophora. In *Encyclopedia of Parasitology* (pp. 1594–1594). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Mekaru, S. R., Marks, S. L., Felley, A. J., Choulcha, N., Kass, P. H., Chouicha, N., & Kass, P. H. (2007). Comparison of direct immunofluorescence, immunoassays, and fecal flotation for detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in naturally exposed cats in 4 Northern California animal shelters. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(5), 959–965. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb03049.x>
- Midleij, V., & Benchimol, M. (2009). *Giardia lamblia* behavior during encystment: how morphological changes in shape occur. *Parasitology International*, 58(1), 72–80.
- Mirhashemi, M. E., Zintl, A., Grant, T., Lucy, F. E., Mulcahy, G., & De Waal, T. (2015). Comparison of diagnostic techniques for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in animal samples. *Experimental Parasitology*, 151–152, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.01.018>
- Moorhead, A. R. (2017). *Giardia* spp. *Plumb's Therapeutics Brief*, 37–38. Acedido em Mar. 21, 2019, disponível em: https://files.brief.vet/migration/article/40441/ptb_pathpro_Giardia-40441-article.pdf
- Morgado, G. M. (2016). *Parasitoses internas e frequência de desparasitação em cães do concelho de Vila Franca de Xira, Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.
- Moron-Soto, M., Gutierrez, L., Sumano, H., Tapia, G., & Alcala-Canto, Y. (2017). Efficacy of nitazoxanide to treat natural *Giardia* infections in dogs. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-1998-7>
- Mosallanejad, B., Hamidinejat, H., Avizeh, R., Ghorbanpoor Najafabadi, M., & Razi Jalali, M. H. (2010). Antigenic detection of *Cryptosporidium parvum* in urban and rural dogs in Ahvaz district, southwestern Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 11(3), 273–278.
- Neves, D., Lobo, L., Simões, P. B., & Cardoso, L. (2014). Frequency of intestinal parasites in pet dogs from an urban area (Greater Oporto, northern Portugal). *Veterinary Parasitology*, 200(3–4), 295–298. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.11.005>

- Nichols, G. L. (1992). *The biology, epidemiology and typing of Cryptosporidium spp.* Surrey: School of Biological Sciences - University of Surrey.
- Nicolas, C., & Rigaut, D. (2018). A field clinical study to confirm the efficacy & safety of a metronidazole-based oral suspension in dogs naturally infested by giardiasis: comparison to fenbendazole, 16(2), 110–117.
- Nunes, R. (2014). *Rastreio de formas parasitárias em fezes de cães recolhidas em espaços públicos na região de Beja*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.
- Olabanji, G. M., Maikai, B. V., & Otolorin, G. R. (2016). Prevalence and risk factors associated with faecal shedding of *Cryptosporidium* oocysts in dogs in the federal capital territory, Abuja, Nigeria. *Veterinary Medicine International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4591238>
- Oliveira-Sequeira, T. C. G., Amarante, A. F. T., Ferrari, T. B., & Nunes, L. C. (2002). Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 103(1–2), 19–27. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00575-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00575-1)
- Omoruyi, B. E., Nwodo, U. U., Udem, C. S., & Okonkwo, F. O. (2014). Comparative diagnostic techniques for *Cryptosporidium* infection. *Molecules*, 19(2), 2674–2683. <https://doi.org/10.3390/molecules19022674>
- Ortega-Pierres, M. G., Jex, A. R., Ansell, B. R. E., & Svärd, S. G. (2017). Recent advances in the genomic and molecular biology of *Giardia*. *Acta Tropica*, (September). <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.004>
- Ortega-Pierres, M. G., Smith, H. V., Cacciò, S. M., & Thompson, R. C. A. (2009). New tools provide further insights into *Giardia* and *Cryptosporidium* biology. *Trends in Parasitology*, 25(9), 410–416. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.06.002>
- Ortuño, A., & Castellà, J. (2011). Intestinal parasites in shelter dogs and risk factors associated with the facility and its management. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 66(3), 103–107.
- Ortuño, A., Scorza, V., Castellà, J., & Lappin, M. (2014). Prevalence of intestinal parasites in shelter and hunting dogs in Catalonia, Northeastern Spain. *The Veterinary Journal*, 199(3), 465–467. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2013.11.022>
- Overgaauw, P. A. M., van Zutphen, L., Hoek, D., Yaya, F. O., Roelfsema, J., Pinelli, E., van Knapen, F., Kortbeek, L. M. (2009). Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, 163(1–2), 115–122. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2009.03.044>
- Paoletti, B., Traversa, D., Iorio, R., De Berardinis, A., Bartolini, R., Salini, R., & Cesare, A. Di. (2015). Zoonotic parasites in feces and fur of stray and private dogs from Italy. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4402-6>
- Papazahariadou, M., Founta, A., Papadopoulos, E., Chliounakis, S., Antoniadou-Sotiriadou, K., & Theodorides, Y. (2007). Gastrointestinal parasites of shepherd and hunting dogs in the Serres Prefecture, Northern Greece. *Veterinary Parasitology*, 148(2), 170–173. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2007.05.013>

- Papich, M. G. (2016). *Saunders handbook of veterinary drugs: small and large animal* (4th ed.). WB Saunders Co. Acedido em Mar. 23, 2019, disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780323244855/saunders-handbook-of-veterinary-drugs>
- Papini, R., & Cardini, G. (2006). Evaluation of a rapid *Cryptosporidium*/*Giardia* immunochromatographic test for diagnosis of giardiasis in dogs. *Rev. Med Vet*, 157(10), 490–493.
- Papini, R., Carreras, G., Marangi, M., Mancianti, F., & Giangaspero, A. (2013). Use of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of *Giardia duodenalis* in dog stools in the environment: a bayesian evaluation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(3), 418–422. <https://doi.org/10.1177/1040638713485583>
- Papini, R., Gorini, G., Spaziani, A., & Cardini, G. (2005). Survey on giardiasis in shelter dog populations. *Veterinary Parasitology*, 128(3–4), 333–339. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2004.12.005>
- Pereira da Fonseca, I.M.S. (2000). *Contribuição para o estudo da criptosporidiose animal em Portugal: Caracterização genética de isolados de Cryptosporidium parvum de origem bovina*. Tese de Doutoramento. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.
- Peterson, M. E., & Talcott, P. A. (2013). *Small animal toxicology*. Elsevier/Saunders.
- Pipia, A. P., Varcasia, A., Tamponi, C., Sanna, G., Soda, M., Paoletti, B., Traversa, D., Scala, A. (2014). Canine giardiasis in Sardinia Island, Italy: prevalence, molecular characterization, and risk factors. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(5), 655–660. <https://doi.org/10.3855/jidc.4255>
- Pitães, A., & Carvalho, M. De. (2016). Papel do parasitismo por *Giardia* sp. em sistemas de produção canina - resultados em canis de criação na região de Viseu , Portugal. *Veterinary Medicine*. Acedido em Abr. 6, 2018, disponível em https://www.researchgate.net/publication/275100527_Papel_do_parasitismo_por_Giardia_sp_em_sistemas_de_producao_canina_-_Resultados_em_canis_de_criacao_na_regiao_de_Viseu_Portugal
- Położowski, A., Jelonek, N., Cekiera, A., & Piekarska, J. (2016). Tinidazole in treatment of *Giardia duodenalis* infections in dogs. *Annals of Parasitology*, 62.
- Ramsey, I. (2017). *BSAVA small animal formulary*. Gloucester, England.
- Raza, A., Rand, J., Qamar, A., Jabbar, A., & Kopp, S. (2018). Gastrointestinal parasites in shelter dogs: occurrence, pathology, treatment and risk to shelter workers. *Animals*, 8(7), 108. <https://doi.org/10.3390/ani8070108>
- Reiczigel, J., Földi, j., & Ózsvári, L. (2010). Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test. *Epidemiology and Infection*, 138(11), 1674–1678.
- Riggs, M. W. (2018). Cryptosporidiosis in cats, dogs, ferrets, raccoons, opossums, rabbits and non-human primates. In J. P. Dubey, C. A. Speer & R. Fayer (Eds.), *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. Boca Raton: CRC Press. Acedido em Abr. 6, 2018, disponível em https://books.google.pt/books?id=MrthDwAAQBAJ&pg=PT205&dq=Cryptosporidium+distemper&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwjD0u_t2sfDAhUIIMAKHS3YA0AQ6AEILzAB#v=onepage&q&f=false

- Rimhanen-Finne, R., Enemark, H. L., Kolehmainen, J., Toropainen, P., & Hänninen, M. L. (2007). Evaluation of immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay in detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, 145(3–4), 345–348. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.01.008>
- Rishniw, M., Liotta, J., Bellosa, M., Bowman, D., & Simpson, K. W. (2010). Comparison of 4 *Giardia* diagnostic tests in diagnosis of naturally acquired canine chronic subclinical Giardiasis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(2), 293–297. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0475.x>
- Rosoff, J. D., Sanders, C. A., Sonnad, S. S., De Lay, P. R., Hadley, W. K., Vincenzi, F. F., Yajko, D. M., O'Hanley, P. D. (1989). Stool diagnosis of giardiasis using a commercially available enzyme immunoassay to detect *Giardia*-specific antigen 65 (GSA 65). *Journal of Clinical Microbiology*, 27(9), 1997–2002.
- Ryan, U., & Cacciò, S. M. (2008). Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 160, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.04.006>
- Ryan, U. & Cacciò, S. M. (2013). Zoonotic potential of *Giardia*. *International Journal for Parasitology*, 43(12–13), 943–956.
- Ryan, U., Fayer, R. & Xiao, L. (2014). *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*, 141(13), 1667–1685. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001085>
- Ryan, U. & Hijawi, N. (2015). New developments in *Cryptosporidium* research. *International Journal for Parasitology*, 45(6), 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.01.009>
- Ryan, U., Paparini, A., Monis, P. & Hijawi, N. (2016). It's official – *cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry? *Water Research*, 105(September 2016), 305–313.
- Ryan, U. & Xiao, L. (2014). Taxonomy and epidemiology of *Cryptosporidium*: taxonomy and molecular taxonomy. In G. W. S. M. Cacciò (Ed.), *Cryptosporidium: parasite and disease* (pp. 3–6). Wien: Springer. Acedido em Abr. 20, 2018, disponível em https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=wI26BAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR5&dq=Cryptosporidium+Taxonomy&ots=ZhmBNQvUhq&sig=7ZGuhZ9IJdKApd0N7BFBHgZjGIE&redir_esc=y#v=onepage&q=Cryptosporidium+Taxonomy&f=false
- Ryan, U., Zahedi, A., & Paparini, A. (2016). *Cryptosporidium* in humans and animals—a one health approach to prophylaxis. *Parasite Immunology*, 38(9), 535–547. <https://doi.org/10.1111/pim.12350>
- Saleh, M. N., Gilley, A. D., Byrnes, M. K., & Zajac, A. M. (2016). Development and evaluation of a protocol for control of *Giardia duodenalis* in a colony of group-housed dogs at a veterinary medical college. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 249(6), 644–649. <https://doi.org/10.2460/javma.249.6.644>
- Santos, A. R. R. (2016). *Evaluation of faecal sampling methods for the analysis of Giardia sp. in companion animals*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.

- Santos, J. P. G. A. B. dos. (2014). *Estudo observacional transversal de parasitas em cães errantes no concelho de Vila Franca de Xira, Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.
- Scaramozzino, P., Di Cave, D., Berrilli, F., D'Orazi, C., Spaziani, A., Mazzanti, S., Scholl, F., De Liberato, C. (2009). A study of the prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* infecting kennelled dogs. *The Veterinary Journal*, 182(2), 231–234. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2008.07.003>
- Scheffler, E. H., & Van Etta, L. L. (1994). Evaluation of rapid commercial enzyme immunoassay for detection of *Giardia lamblia* in formalin-preserved stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(7), 1807–1808.
- Scorza, V. (2013). Giardiasis. *Clinician's Brief*, 11(2), 71–74. Acedido em Mar. 23, 2019, disponível em: https://files.brief.vet/migration/article/8136/giardiasis_0-8136-article.pdf
- Scorza, V., & Lappin, M. R. (2012a). Cryptosporidiosis and cyclosporiasis: cryptosporidiosis. In C. E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat* (4th ed., pp. 840–849). Philadelphia: WB Saunders Co.
- Scorza, V., & Lappin, M. R. (2012b). Enteric protozoal infections: giardiasis. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat* (4th ed., pp. 785–792). Philadelphia: WB Saunders Co.
- Scorza, V., & Tangtrongsup, S. (2010). Update on the diagnosis and management of *Cryptosporidium* spp. infections in dogs and cats. *Topics in Companion Animal Medicine*, 25(3), 163–169. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2010.07.007>
- Shahiduzzaman, M., & Daugschies, A. (2012). Therapy and prevention of cryptosporidiosis in animals. *Veterinary Parasitology*, 188(3–4), 203–214. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.052>
- Sheffield, H. G., & Bjorvat, B. (1977). Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 26(1), 23–30.
- Silva, M. S. S. da. (2010). *Rastreio de parasitas gastrintestinais, pulmonares, cutâneos e musculares em canídeos domésticos e silvestres no Norte de Portugal*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.
- Šlapeta, J. (2013). Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow? *International Journal for Parasitology*, 43(12–13), 957–970.
- Smith, H. (2007). Diagnostics. In R. Fayer & L. Xiao (Eds.), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis* (2nd ed., pp. 178–202). Boca Raton: CRC Press. Acedido em Fev. 19, 2019, disponível em https://books.google.pt/books?id=suJZXO2_gK0C&printsec=frontcover&dq=Cryptosporidium+and+cryptosporidiosis&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwilkPKxt7ngAhULtRoKHdvXCEsQ6AEIKTAA#v=onepage&q&f=false
- Smith, H. V., Nichols, R. A. B., & Grimason, A. M. (2005). *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology*, 21(3), 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.01.007>

- Soares, R., & Tasca, T. (2016). Giardiasis: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. *Journal of Microbiological Methods*, 129, 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.08.017>
- Solari, A. J., Rahn, M. I., Saura, A., & Lujan, H. D. (2003). A unique mechanism of nuclear division in *Giardia lamblia* involves components of the ventral disk and the nuclear envelope. *Biocell*, 27(3), 329–346.
- Sommer, M. F., Rupp, P., Pietsch, M., Kaspar, A., & Beelitz, P. (2018). *Giardia* in a selected population of dogs and cats in Germany – diagnostics, coinfections and assemblages. *Veterinary Parasitology*, 249(November 2017), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.11.006>
- Staff, T. P. O. (2014). Correction: a detailed, hierarchical study of *Giardia lamblia*'s ventral disc reveals novel microtubule-associated protein complexes. *PLoS ONE*, 9(6), e99456.
- Sulaiman, I. M., & Cama, V. (2006). The biology of *Giardia* parasites. In *Foodborne Parasites* (pp. 15–32). Boston, MA: Springer US.
- Tams, T. R. (2003). Chronic diseases of the small intestine. In T.R. Tams (Ed.), *Handbook of small animal gastroenterology* (2nd ed., p. 486). Missouri: WB Saunders Co. Acedido em Mar. 25, 2019, disponível em: https://books.google.pt/books?id=2rRNYfOloaEC&pg=PA214&lpg=PA214&dq=quinacrine+dogs+elsevier&source=bl&ots=qgB4pAiOUV&sig=ACfU3U3zWQGY12h9CvXg-QbSzivWbW0_rA&hl=pt-PT&sa=X&ved=2ahUKEWjy-Z_alqbhAhXw1-AKHT6yDN0Q6AEwB3oECAkQAQ#v=onepage&q=quinacrine dogs
- The Center for Food Security & Public Health. (2018). Cryptosporidiosis. Acedido em Abr. 29, 2019, disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/cryptosporidiosis.pdf>
- The Center for Food Security & Public Health. (2012). Giardiasis. Acedido em Mai. 3, 2018, disponível em: www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/giardiasis.pdf
- Thompson, R. C. A. (2005). Phylogenetic relationships and taxonomy. In J. R. Baker, R. Muller, & D. Rollinson (Eds.), *Advances in Parasitology* (pp. 79–85). Academic Press. Acedido em Abr. 20, 2018, disponível em: https://books.google.pt/books?id=WWj2Uh1Aez0C&pg=PA80&lpg=PA80&dq=multi-membranous+attachment&source=bl&ots=bJZIGkV7T-&sig=G86j2catAqpMjm3wQndd_4NU4UM&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwiwy8CVgLHaAhXJ8RQKHxoxDMgQ6AEIOjAC#v=onepage&q=multi-membranous attachment&f=fa
- Thompson, R. C. A. & Ash, A. (2016). Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infection, Genetics and Evolution*, 40, 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.09.028>
- Thompson, R. C. A. & Monis, P. T. (2011). Taxonomy of *Giardia* species. In *Giardia* (pp. 3–15). Vienna: Springer Vienna.
- Thompson, R. C. A. & Monis, P. T. (2012). *Giardia*—from genome to proteome. In *Advances in parasitology* (Vol. 78, pp. 57–95).
- Titilincu, A., Mircean, V., Achelaritei, D., & Cozma, V. (2010). *Prevalence of Cryptosporidium spp. in asymptomatic dogs by ELISA and risk factors associated with infection* (Vol. XLIII (1)). Cluj, Romania. Acedido em Jun, 2019, disponível em https://usab-tm.ro/vol10MV/2_vol10.pdf

- Traub, R. J., Inpankaew, T., Reid, S. A., Sutthikomchai, C., Sukthana, Y., Robertson, I. D., & Thompson, R. C. A. (2009). Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in temple communities in Bangkok-a critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. *Acta Tropica*, 111(2), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.03.006>
- Tzipori, S. & Griffiths, J. K. (1998). Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. In J.R. Baker, R. Muller, D. Rollinson & S. Tzipori (Eds.), *Opportunistic protozoa in humans* (pp. 6–8). London, UK: Academic Press. Acedido em Abr. 6, 2018, disponível em https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=X8x7eU07M5QC&oi=fnd&pg=PA5&ots=t2gRa_TKsx&sig=d2_8xJslnftE-QKkBq8tA754Rs&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Uchôa, F. F. de M., Sudré, A. P., Campos, S. D. E., & Almosny, N. R. P. (2018). Assessment of the diagnostic performance of four methods for the detection of *Giardia duodenalis* in fecal samples from human, canine and feline carriers. *Journal of Microbiological Methods*, 145(October 2017), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.01.001>
- Uehlinger, F. D., Naqvi, S. A., Greenwood, S. J., McClure, J. T., Conboy, G., O’Handley, R., & Barkema, H. W. (2017). Comparison of five diagnostic tests for *Giardia duodenalis* in fecal samples from young dogs. *Veterinary Parasitology*, 244(July), 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.030>
- Uiterwijk, M., Nijse, R., Kooyman, F. N. J., Wagenaar, J. A., Mughini-Gras, L., Koop, G., & Ploeger, H. W. (2018). Comparing four diagnostic tests for *Giardia duodenalis* in dogs using latent class analysis. *Parasites & Vectors*, 11(1), 439. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3014-2>
- Upjohn, M., Cobb, C., Monger, J., Geurden, T., Claerebout, E., & Fox, M. (2010). Prevalence, molecular typing and risk factor analysis for *Giardia duodenalis* infections in dogs in a central London rescue shelter. *Veterinary Parasitology*, 172(3–4), 341–346. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2010.05.010>
- Ural, K., Gultekin, M., Pasa, S., Aysul, N., & Ayan, A. (2017). Chloroquine treatment against naturally occurring *Giardia duodenalis* infection in dogs. *Medycyna Weterynaryjna*, 73(5), 280–283. <https://doi.org/10.21521/mw.5695>
- Van den Bossche, D., Cnops, L., Verschueren, J., & Van Esbroeck, M. (2015). Comparison of four rapid diagnostic tests, ELISA, microscopy and PCR for the detection of *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba histolytica* in feces. *Journal of Microbiological Methods*, 110, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.01.016>
- Veazie, L., Brownlee, I. & Sears H.J. (1979). An outbreak of gastroenteritis associated with *Giardia lamblia*. In W. Jakubowski & J. Hoff (Eds.), *Waterborne Transmission of Giardiasis: Proceedings of a Symposium* (pp. 174–175). Ohio: Environmental Protection Agency. Acedido em Abr. 5, 2018, disponível em https://books.google.pt/books?id=ciEoaOcf0mwC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=snippet&q=commensal&f=false
- Villeneuve, V., Beugnet, F., & Bourdoiseau, G. (2000). Efficacy of oxfendazole for the treatment of giardiasis in dogs. Experiments in dog breeding kennels. *Parasite*, 7(3), 221–226. <https://doi.org/10.1051/parasite/2000073221>
- Xiao, L. (2010). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, 124(1), 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.018>

- Xiao, L., & Fayer, R. (2008). Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, 38(11), 1239–1255. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.006>
- Xu, P., Widmer, G., Wang, Y., Ozaki, L. S., Alves, J. M., Serrano, M. G., Buck, G. A. (2004). The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature*, 431(7012), 1107–1112.
- Ward, W., Alvarado, L., Rawlings, N. D., Engel, J. C., Franklin, C., & McKerrrow, J. H. (1997). A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*. *Cell*, 89(3), 437–444.
- WHO Expert Committee. 1981. Intestinal protozoan and helminthic infections. WHO Tech. Rep. Ser. 58:666–671. Acedido em Out. 21, 2018, disponível em <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41519>
- Winiecka-Krusnell, J., & Linder, E. (1995). *Detection of Giardia lamblia cysts in stool samples by immunofluorescence using monoclonal antibody*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* (Vol. 14).
- World Health Organization. (2006). WHO Guidelines for Drinking Water Quality: *Cryptosporidium*. Acedido em Out. 22, 2018, disponível em https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq0506.pdf
- Zaglool, D. A. M., Mohamed, A., Khodari, Y. A. W., & Farooq, M. U. (2013). Crypto-*Giardia* antigen rapid test versus conventional modified ziehl-neelsen acid fast staining method for diagnosis of cryptosporidiosis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(3), 212–215. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60025-5](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60025-5)
- Zahedi, A., Paparini, A., Jian, F., Robertson, I. & Ryan, U. (2016). Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: critical insights into better drinking water management. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 5(1), 88–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.12.001>
- Zajac, A. M., & Conboy, G. A. (2012). *Veterinary clinical parasitology*. Wiley-Blackwell. Acedido em Jan. 15, 2019, disponível em https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=8z7wr0wphzoC&oi=fnd&pg=PR9&ots=qS54uYdx_Q&sig=joUj2TGDabKMNI5rnBUNp3E0BDQ&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Zajac, A. M., & Lindsay, D. S. (2004). *Cryptosporidium* infections in cats and dogs. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 26, 864–874.
- Zygner, W., Jaros, D., Gójska-Zygner, O., & Wedrychowicz, H. (2008). Azithromycin in the treatment of a dog infected with *Giardia intestinalis*. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 11(3), 231–234.

Anexo I – Espécies válidas do género *Cryptosporidium*, organizadas consoante os hospedeiros principais, outros hospedeiros e associação com criptosporidiose humana Adaptado de Holubová et al., 2016; Kváč et al., 2016; Mehlhorn, 2016b; Zahedi et al., 2016b.

Espécies	Hospedeiros principais	Outros hospedeiros	Associação com criptosporidiose humana
<i>C. rubeyi</i>	Esquilo terrestre da Califórnia	Esquilos	Não reportado
<i>C. scophthalmi</i>	Pregado	—	Não reportado
<i>C. huwi</i>	Peixe <i>Guppy</i> , Peixe <i>Neon tetra</i> , barbo tigre	Peixes	Não reportado
<i>C. erinacei</i>	Ouriço-cacheiro	Ouriços, equinos	Raramente reportado
<i>C. scrofarum</i>	Suínos	—	Raramente reportado
<i>C. viatorum</i>	Humanos	—	Raramente reportado
<i>C. tyzzeri</i>	Rato-doméstico	Roedores	Raramente reportado
<i>C. cuniculus</i>	Coelho-bravo	Coelhos	Ocasional, casos sazonais, esporádicos, no Reino-Unido, França e Nigéria
<i>C. ubiquitum</i> (antigo genótipo cervino)	Ruminantes domésticos	Ruminantes, roedores e primatas	Casos esporádicos em vários países
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos	Caprinos	Não reportado
<i>C. ryanae</i>	Ruminantes domésticos	—	Não reportado
<i>C. macropodum</i>	Canguru cinza oriental	Marsupial	Não reportado
<i>C. fragile</i>	Sapo	—	Não reportado
<i>C. fayeri</i>	Canguru	Marsupiais	Raramente reportado
<i>C. bovis</i> (antigo genótipo bovino B)	Ruminantes domésticos	—	Raramente reportado
<i>C. suis</i> (antigo genótipo suíno I)	Suínos	—	Raramente reportado
<i>C. galli</i>	Galináceos	Aves	Não reportado

Anexo I (continuação) – Espécies válidas do género *Cryptosporidium*, organizadas consoante os hospedeiros principais, outros hospedeiros e associação com criptosporidiose humana. Adaptado de Holubová et al., 2016; Kváč et al., 2016; Mehlhorn, 2016b; Zahedi et al., 2016b.

<i>C. hominis</i> (antigos genótipo humano <i>C. parvum</i> , genótipo I e genótipo H)	Humanos	—	Frequentemente reportado (espécie mais comum em humanos)
<i>C. molnari</i>	Robalo e dourada	Peixes	Não reportado
<i>C. canis</i>	Cães	Canídeos	Casos esporádicos, especialmente nos países em desenvolvimento
<i>C. andersoni</i>	Ruminantes domésticos	—	Raramente reportado
<i>C. varanii</i>	Lagarto-esmeralda	Répteis	Não reportado
<i>C. baileyi</i>	Galináceos	Aves	Não reportado
<i>C. parvum</i> (antigos genótipo bovino II e genótipo B)	Ruminantes domésticos	Mamíferos, humanos	Frequentemente reportado
<i>C. meleagridis</i>	Aves homeotérmicas, mamíferos	Humanos, mamíferos	Frequentemente reportado
<i>C. serpentis</i>	Cobras	Répteis	Não reportado
<i>C. felis</i>	Felídeos	—	Casos esporádicos em vários países
<i>C. wrairi</i>	Porquinho-da-índia	—	Não reportado
<i>C. proliferans</i>	Rato-toupeira do nordeste africano	Equídeos, asininos, esquilo-cinzento-oriental, búfalo africano	Não reportado
<i>C. avium</i>	Periquito-de-coroa-vermelha	Roseicollis, galináceos, papagaio-de-fronte-azul, caturra	Não reportado
<i>C. muris</i>	Murganho	Roedores	Raramente reportado

Anexo II – Combinação de resultados dos vários métodos de diagnóstico utilizados na detecção de *Giardia* spp. (n=60).

IFD	Flutuação Zn	Coloração Ziehl-Neelsen	n	%
+	+	+	6	10
+	+	–	9	15
+	–	+	1	1,7
+	–	–	4	6,7
–	+	+	1	1,7
–	+	–	2	3,3
–	–	+	2	3,3
–	–	–	35	58,3

Legenda: n – número de amostras; % - percentagem

Anexo III – Combinação de resultados dos vários métodos de diagnóstico utilizados na detecção de *Cryptosporidium* spp. (n=60).

IFD	Coloração Ziehl-Neelsen	n	%
+	+	2	3,3
+	–	1	1,7
–	+	1	1,7
–	–	56	93,3

Anexo IV – Dados da população canina estudada.

Amostra	Sexo	Idade (anos)	Raça	Origem	Canil	Tipo fezes	Zn	IFD - <i>Giardia</i>	Ziehl-Neelsen <i>Giardia</i>	IFD-Crypto.	Ziehl-Neelsen Crypto.	Coinfeção
1	M	8	Indet.	Canil	Lisboa	Pastosas	N	N	N	N	N	N
2	M	5	Indet.	Canil	Lisboa	Pastosas	P	P	P	N	N	N
3	M	8	Indet.	Canil	Lisboa	Pastosas	P	P	P	N	N	N
4	–	–	–	Canil	Lisboa	Pastosas	P	P	P	N	N	N
5	M	–	Indet.	Canil	Lisboa	Líquidas	P	P	P	P	P	N
6	F	4	Braco Alemão	Clínica	N/A	Pastosas	N	N	N	N	N	Ancylostom atidae Ancylostom atidae
7	M	1	Braco Alemão	Clínica	N/A	Líquidas	P	P	N	N	N	
8	F	10	Indet.	Canil	Cascais	Moldadas	N	N	N	N	N	N
9	F	0,6	Indet.	Canil	Cascais	Moldadas	N	N	N	N	N	N
10	M	2	Indet.	Canil	Cascais	Moldadas	N	N	N	N	N	N
11	M	5	Indet.	Canil	Cascais	Moldadas	N	N	N	N	N	N
12	F	3	Indet.	Canil	Cascais	Moldadas	N	N	N	N	N	N
13	M	10	Indet.	Canil	Cascais	Pastosas	P	N	N	N	N	N
14	M	2	Indet.	Canil	Cascais	Pastosas	N	N	N	N	N	N
15	M	8	Indet.	Canil	Cascais	Pastosas	N	N	N	N	N	N
16	M	10	Indet.	Canil	Cascais	Moldadas	N	N	N	N	N	N
17	M	8	Indet.	Canil	Cascais	Moldadas	N	N	N	N	N	N
18	M	3,5	Indet.	Canil	Lisboa	Pastosas	P	P	N	N	N	N

Anexo IV (continuação) - Dados da população canina estudada.

19	F	0,6	Indet.	Canil	Lisboa	Líquidas	P	P	N	N	P	<i>Cystoisosp ora spp.</i>
20	M	12	Boxer	Canil	Lisboa	Líquidas	P	P	N	N	N	N
21	M	4	Indet.	Canil	Lisboa	Pastosas	N	P	P	N	N	N
22	M	3	Indet.	Canil	Lisboa	Pastosas	P	P	N	N	N	N
23	M	2	Indet.	Canil	Lisboa	Líquidas	P	P	P	N	N	<i>Cystoisosp ora spp.</i>
24	M	12	Labrador Retriever	Canil	Lisboa	Pastosas	N	N	N	N	N	N
25	M	2	Indet.	Canil	Lisboa	Pastosas	P	P	P	N	N	N
26	F	1	Bull Terrier	Canil	Lisboa	Pastosas	P	P	N	N	N	N
27	F	2	Indet.	Canil	Lisboa	Pastosas	N	P	N	N	N	N
28	M	7	Indet.	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	N	N	N	N
29	M	15	Indet.	Clínica	N/A	Pastosas	N	P	N	N	N	N
30	F	8	Bulldog Francês	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	N	N	N	N
31	F	14	Indet.	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	N	N	N	N
32	F	12	Boiadeiro de Berna	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	N	N	N	N
33	M	7	Yorkshire Terrier	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	N	N	N	N
34	M	14	Golden Retriever	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	N	N	N	N
35	F	4	Labrador Retriever	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	P	N	N	N

Anexo IV (continuação) - Dados da população canina estudada.

36	M	7	Golden retriever	Clínica	N/A	Líquidas	N	N	P	N	N	N
37	M	3	Indet.	Canil	Cascais	Pastosas	P	P	N	N	N	<i>Toxocara canis</i>
38	M	7	Indet.	Canil	Cascais	Moldadas	N	P	N	P	N	N
39	M	9	Indet.	Canil	Cascais	Moldadas	N	P	N	N	N	N
40	M	5	Indet.	Canil	Cascais	Pastosas	P	P	N	P	P	N
41	M	7	Indet.	Canil	Cascais	Moldadas	P	P	N	N	N	N
42	M	9	Cocker Spaniel	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	N	N	N	N
43	M	13	Beagle	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	N	N	N	N
44	M	6	Shih Tzu	Clínica	N/A	Pastosas	P	N	N	N	N	N
45	F	6	Yorkshire Terrier	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	N	N	N	N
46	F	1	Labrador Retriever	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	N	N	N	N
47	M	0,6	Indet.	Clínica	N/A	Pastosas	P	N	P	N	N	N
48	F	15	Caniche	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	N	N	N	N
49	M	0,4	Bulldog Francês	Clínica	N/A	Pastosas	N	N	N	N	N	<i>Ancylostom atidae</i>
50	F	7	Épagneul Breton	Clínica	N/A	Pastosas	N	N	N	N	N	<i>Ancylostom atidae</i>
51	M	9	Labrador Retriever	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	N	N	N	N
52	F	2,5	Bulldog Francês	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	N	N	N	<i>Ancylostom atidae</i>
53	F	12,3	Indet.	Clínica	N/A	Pastosas	N	N	N	N	N	N

Anexo IV (continuação) - Dados da população canina estudada.

54	F	3	Indet.	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	N	N	N	N
55	M	15	Indet.	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	N	N	N	N
56	F	3	Jack Russel	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	N	N	N	N
57	F	4	Indet.	Clínica	N/A	Líquidas	N	N	N	N	N	N
58	M	10	Indet.	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	N	N	N	N
59	F	7	Labrador Retriever	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	N	N	N	N
60	F	4	Podengo Português	Clínica	N/A	Moldadas	N	N	N	N	N	N

Legenda: M – macho; F – fêmea; Indet. – indeterminada; N – negativo; P – positivo; Zn – Flutuação após centrifugação com sulfato de zinco; Crypto. – *Cryptosporidium*